

IMPERIAL AGRICULTURAL
RESEARCH INSTITUTE, NEW DELHI.

Zentralblatt

für

Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten

Begründet von Oskar Uhlworm

Zweite Abteilung:

Allgemeine, landwirtschaftliche, technische, Nahrungsmittel-Bakteriologie und Mykologie (einschließlich der Gärungsphysiologie und Enzymologie), Protozoologie, Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, sowie Tierkrankheiten (ausschließlich der in das Gebiet der Medizin gehörenden)

herausgegeben von

Oberregierungsrat Dr. C. Stapp
Berlin-Dahlem, Königin-Luise-Str. 17/19

92. Band

Mit 126 Abbildungen im Text und 2 Tafeln



Jena
Verlag von Gustav Fischer
1935

Alle Rechte vorbehalten
Printed in Germany

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt.

Ausgegeben am 29. April 1935

Nachdruck verboten.

Zur Kenntnis zellulosezersetzender Sporenbildner aus der Bacillus Omelianskii- und Bacillus macerans-Gruppe.

Anreicherung, Reinzucht und Symbiose.

[Aus dem Bakteriologischen Institut der Preußischen Versuchs- und Forschungsanstalt für Milchwirtschaft in Kiel.]

Von **Viktor Meyer.**

Mit 9 Abbildungen im Text.

A. Einleitung.

In der Ernährung der Pflanzenfresser spielt die Zellulose eine relativ bedeutende Rolle. Die Fütterungsversuche von Kellner (18) haben ergeben, daß „Strohstoff" denselben Nährwert für das Rind hat wie Stärkemehl. „Strohstoff" ist ein von Inkrusten befreites Roggenstroh und enthält neben geringen Mengen Pentosanen nur reine Zellulose. Kellner wies nach, daß vom Rinde aus 100 g verdautem „Strohstoff" 25,3 g Fett angesetzt wurden (aus 100 g verdautem Stärkemehl im gleichen Versuch 24,8 g Fett). D. h. nach dem Kalorienwert fanden sich von den 414 Kal. der Zellulose 25,3 · 9,5 = 240 Kal. = 58% im Ansatz wieder.

Ein eigenes Zellulose lösendes Enzym fehlt den höheren Tieren. Die Ausnutzung der Zellulose erfolgt vielmehr auf dem Umwege über die Bakterien. Man nimmt gewöhnlich an, daß die bei der Zellulosezersetzung entstehenden Endprodukte dem Tier als Nahrung dienen. Es soll hier nicht darauf eingegangen werden, wie man im einzelnen den Nährwert der Zellulose zu erklären hat. Das würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen. Uns interessiert nur die Tatsache, daß man bei diesen Betrachtungen von Gäranalysen ausgegangen ist, die aus einer Zellulosezersetzung in vitro mit Bakteriengemischen stammen (Henneberg und Stohmann, 15). Es ist sehr die Frage, ob im Pansen der Wiederkäuer bzw. im Darm der Pflanzenfresser die gleichen Bedingungen wie im Reagenzglas herrschen und daß daher die gleichen Endprodukte entstehen.

Vergleichen wir weiter die Analysen ähnlicher Zellulosezersetzungen mit Bakteriengemischen verschiedener Forscher, so finden wir, daß die Endprodukte weder qualitativ noch quantitativ gleich sind bei äußerlich gleichen Bedingungen.

Es ist einleuchtend, daß mindestens ein großer Teil der Abbauprodukte der Zellulosezersetzung in Anreicherungskulturen, wie man sie z. B. nach den Angaben Omelianskis (23) erhält, im nächsten Augenblick von den jeweiligen Begleitorganismen zu den verschiedenartigsten Endprodukten umgewandelt werden kann. Das mag die verschiedenen Resultate der chemischen Analysen erklären. Daß weder die Begleitflora, noch die eigentlichen Zellulosezersetzer innerhalb gleicher Anreicherungsreihen konstant sind,

das ergeben eigene Untersuchungen an über 300 Kulturen, die teilweise bis zur 25. Passage einer Reihe gingen, das ergibt auch die Tatsache, daß es Kellermann und Mc. Beth (17) gelungen ist, aus den Omelianskischen Originalkulturen eine größere Anzahl verschiedener Begleitorganismen zu isolieren. Man kann sich leicht ausdenken, daß je nach den herrschenden Bedingungen bald der eine, bald der andere Begleitorganismus zur Vorherrschaft gelangen und damit andere Endprodukte in der Zellulosezersetzung liefern kann.

Es interessieren aber die tatsächlichen Leistungen der Zellulosezersetzer ohne irgendwelche Begleitorganismen, wenn wir ihre Bedeutung in der Natur kennenlernen wollen.

Dazu ist vor allem erforderlich, die Zellulosezersetzer absolut rein zu züchten, und an Hand der Reinkulturen die Lebensbedürfnisse dieser Bakterien zu untersuchen. Im Darmtraktus interessiert uns neben den Endprodukten der Zellulosezersetzung besonders die Frage nach dem N-Bedarf der Zellulosezersetzer, d. h. die Frage, welche N-Quellen ausgenutzt werden, ob es Stoffe sind, die das Wirtstier selber verwerten kann oder solche, die für das Wirtstier direkt nicht verwertbar sind, also ohne Bakterien unverdaut den Organismus verlassen würden.

Die Aufgabe dieser Arbeit wird daher in der Erzielung absoluter Reinkulturen anaerober Zellulosebakterien aus dem Darm gesehen. An ihnen sollen die Lebensbedürfnisse und Leistungen dieser Bakteriengruppe studiert werden, um dann evtl. Rückschlüsse auf den Vorgang der Zellulosezersetzung im Darm machen zu können.

B. Die Reinzüchtung von Zellulosezersetzern.

I. Die bisherigen Methoden der Reinzucht von anaeroben Zellulosezersetzern.

In den letzten Jahren sind verschiedene Arbeiten über die Zersetzung der Zellulose erschienen, aber nur wenige befassen sich erfolgreich mit der Reinkultur von aeroben Zellulosezersetzern. Es sind dies die Arbeiten von Clausen 1931 (5) und Cowles und Rettger 1930 (6). Beide arbeiteten nach den Angaben von Omelianski: Durch wiederholte Überimpfung in eiweißfreie Nährlösung mit Filtrierpapier reicherten sie die Zellulosezersetzer an. Aus diesen Anreicherungen wollen beide den Erreger der Wasserstoffgärung Omelianskis reingezüchtet haben. 1933 erschien eine Arbeit von Snieszko (34) über die Isolierung von thermophilen Zellulosezersetzern, die evtl. auch zur Reinzucht anaerober Zellulosezersetzer geeignet sein konnte. Darauf wird an anderer Stelle noch einzugehen sein.

Clausen brachte nach 6 maliger Passage in eiweißfreier Nährlösung[1]) die Kultur in Zellulose-Leber-Bouillon. Hierin kam erst B. putrificus verrucosus als Begleitorganismus zur Entwicklung, die Gasbildung sistierte nach 2 Tagen, um nach 4 Tagen durch die Gasbildung des B. Omelianskii — so nennt Clausen diesen Zellulosezersetzer — abgelöst zu werden. Etwa am 6. Tage gießt Clausen hieraus anaerobe Platten auf Bouillon-Asparaginagar. Nach 6 tägiger Bebrütung bei 37° erhielt er Kolonien mit Formen des B. Omelianskii mit Sporen. Mit der Kapillarpipette wurden diese Kolonien dann ausgestochen und in Zellulose-Leber-Bouillon übergeimpft. (Ob er diese Kolonien auch direkt in die Nähr-

[1]) N-L 4, ein Verzeichnis der Nährlösungen findet sich am Schluß der Arbeit.

lösung 4 geimpft hat, gibt er nicht an.) Er schreibt: Es zeigt sich, daß der B. Omelianskii erst seine volle Fähigkeit entfalten kann, wenn er mit B. putrificus verrucosus Zeißler oder einem Stamm der Zellulose-Clostridien vergesellschaftet ist. In Reinkultur in Zellulose-Leber-Bouillon oder Zellulose-Asparagin-Bouillon oder in den verschiedenen anderen Nährlösungen 1—4 greift der Bazillus nur sehr langsam an, er versport erst in flüssigen Nährböden nach 4—6 Wochen."

Die Gasanalysen ergaben nur H_2 und CO_2 in Mengen, die von denen der Wasserstoffgärung Omelianskii nicht stark abweichen sollen. Aus den Methangärungskulturen erhielt Clausen einen morphologisch ähnlichen Organismus, der in Reinkultur mit B. putrificus zusammen ebenfalls nur H_2 und CO_2, aber kein CH_4 bildete. Clausen glaubt hieraus schließen zu dürfen, daß beide Organismen identisch sind.

Es ist eine sehr wesentliche Feststellung, daß bei der Methan- und auch der Wasserstoffgärung Organismen isoliert wurden, die mit B. putrificus in Symbiose beide nur Wasserstoff, aber kein Methan bilden. Clausen läßt die Beantwortung dieser Frage noch offen.

Angaben über die Bedeutung des Symbionten für die Zellulosezersetzung werden nicht gegeben.

Cowles und Rettger gelang es weder durch wiederholtes Überimpfen und Erhitzen, noch durch die Verdünnungsmethode nach Khouvine (19) zu Reinkulturen zu kommen. Auf festen Nährböden (den üblichen Standardnährböden und auch den speziell für Zellulosezersetzer angegebenen Nährböden nach Kellermann u. a.) erhielten sie in nur ganz wenig Fällen Wachstum. Abimpfungen hiervon führten nie zu Zersetzungen. Sie griffen daher auf das Ausschneideverfahren zurück, das Werner (38) zur Isolierung seines B. cellulosam fermentans aus dem Darm der Rosenkäferlarve, Potosia cuprea, anwendete: Ein Stück des zersetzten Papiers wurde über die Oberfläche eines Nähragars ausgestrichen. Die Platten wurden 24 Std. bebrütet und dann alle Gebiete mit Koloniewachstum mit einem sterilen Messer herausgeschnitten. Die Platten wurden dann weiter bebrütet und, wenn sich kein weiteres Wachstum mehr zeigte, mit einem sterilen Baumwolläppchen abgewischt, um die noch ruhenden Sporen des gewünschten Organismus zu erhalten. Mit dem Läppchen wurde dann ein Röhrchen mit der Omelianski-Lösung beimpft. Nach 4—10 Tagen trat Zersetzung ein. Hieraus wurden dann neue Platten auf gewöhnlichem Agar, anaerob und aerob, gegossen, und wenn es sich zeigte, daß hier kein Wachstum eintrat, wurden die Kulturen als rein angesehen. Der Zellulosezersetzer von Werner, übrigens wie der von Khouvine mit ovaler Spore, muß danach Zellulose symbiontenfrei zersetzt haben, im Gegensatz zu den rundsporigen Organismen von Clausen und Cowles und Rettger; die von mir untersuchten Formen, worunter auch solche waren, die den Organismen von Werner und Khouvine sehr ähnlich sind (Abb. 1 und 2), zersetzten die Zellulose ebenfalls in anorganischer Lösung nur in Symbiose mit anderen Organismen, was vorausgenommen sein möge.

Cowles und Rettger wischten den Agar nach dem Ausstechen der Begleitorganismen nicht mit einem Baumwolläppchen ab, sondern zerschnitten den restlichen Agar und füllten ihn in Röhrchen mit Filtrierpapier. In positiven Röhrchen, d. h. in solchen mit Zelluloselösung, zeigte sich stets ein Organismus mit ovaler Spore. In anderen Röhrchen, in denen sich nur

die ruhenden Sporen des Zellulosezersetzers befanden, trat erst dann eine Zersetzung ein, wenn zufällig eine Verunreinigung hineingelangte. In weiteren Versuchen erhielten sie auch dann eine Zersetzung, wenn Bact. coli, aerogenes oder vulgare zugegen war. Dadurch war ihnen ein neuer Weg zur Isolierung gegeben. Sie füllten wie gewöhnlich den zerschnittenen Agar in die Röhrchen und gaben Bact. coli als Symbiont hinzu. Nach erfolgter Zersetzung töteten sie Bact. coli durch 10 Min. lange Erhitzung auf 80° ab; trat dann in weiteren Röhrchen keine Zersetzung ein, so hatten sie Reinkulturen des Zellulosezersetzers vor sich. Durch Zugabe von Bact. coli konnte später wieder eine Zersetzung hervorgerufen werden.

Es ist nun außerordentlich interessant, daß diese Symbiose durch eine geeignete Nährlösung ersetzt werden kann, nämlich durch ein Rindfleischwasser mit Zusatz von K_2HPO_4 und Pepton. (Zu ähnlichen Ergebnissen war



Abb. 1. Abb. 2.

Abb. 1. Stecknadelform mit ovaler Spore auf Zellulosefaser. Die endständige Anschwellung hat sich mit Jodlösung rot bis gelbbraun gefärbt. Anreicherung aus Meerschweinchen-Blinddarm. Vergr. 500×.

Abb. 2. Derselbe Organismus. Vergr. 800×.

auch ich mit Asparagin-Bouillon bei einem aeroben Zellulosezersetzer mit ovaler Spore gekommen, der weiter unten noch zu beschreiben sein wird.) In dieser Nährlösung trat nach 3—5 Tagen Zersetzung unter Gasbildung ein. Bei Zusatz von Dextrin und Agar erhielten Cowles und Rettger auch Koloniewachstum unter anaeroben Bedingungen. Für eine direkte Isolierung erwies sich dieser Agar jedoch als nicht geeignet. In Kulturflaschen von 240 ccm Inhalt wurden in 5 Tagen 130 ccm Gas gebildet, davon waren 79% H_2 und der Rest CO_2.

II. Eigene Untersuchungen.

Ich hatte hiernach also zunächst den Versuch zu machen, nach den Angaben Clausens die Zellulosezersetzer zu isolieren. (Die Originalkulturen von Clausen waren leider nicht mehr lebensfähig.) Das Ausschneideverfahren von Werner sollte erst dann angewendet werden, wenn es sich herausstellen sollte, daß es unmöglich ist, mit der Plattenmethode von den gerade vorliegenden Kulturen Reinkulturen zu erzielen.

Denn es ist theoretisch stets möglich, daß bei Anwendung des Ausschneideverfahrens verschiedene Organismen, nicht nur die eigentlichen Zellulosezersetzer, auf dem Agar nicht zum Auskeimen kommen, so daß man ohne weiteres doch noch nicht zu Reinkulturen kommt, eine Vermutung, die sich leider bewahrheitete.

Die zahlreichen eigenen Untersuchungen zeigten, daß die Reinzucht dieser anaeroben Zellulosezersetzer derartige Schwierigkeiten bereitet, daß ich meine Arbeit im wesentlichen darauf beschränken mußte, eine geeignete Reinzüchtungsmethode zu suchen, bzw. die bestehenden Methoden einer eingehenden Prüfung zu unterziehen.

1. Anreicherung der Zellulosezersetzer.

Zur Erzielung von Ausgangskulturen dienten vor allem die Nährlösung 4 von Clausen, die als Nährlösung 13 etwas abgeändert wurde, dann dieselbe Nährlösung ohne Asparagin (Nährlösung 15), ferner die Nährlösung 7 zur Anreicherung von Clostridien und schließlich die Nährlösungen von Bokor (3) und Löhnis und Lochhead (20).

Die Nährlösungen wurden in Einmachegläser (Rex- und Weckgläser von $^3/_4$, $^1/_2$ und $^1/_{10}$ l Fassungsgehalt) und kleine Flaschen mit Patentverschluß (ca. $^1/_4$ l Fassungsgehalt) gefüllt und im Autoklaven bei 110° 30 Min. sterilisiert. Nach der Beimpfung wurden die Gläser im Vakuumexsikkator auf etwa 20—25 mm Hg evakuiert. Durch schnelles Einströmenlassen der Luft in den Exsikkator wird das evakuierte Weckglas geschlossen. Auf diese Weise kann man ausgezeichnet die aerobe Begleitflora auf ein Minimum herabdrücken. Das verwendete Impfmaterial stammte aus Rinderpansen, Rinderfäzes, Menschenfäzes, Pferdefäzes, Meerschweinchenblinddarm, Tümpelschlamm u. a.

Je nach den Umständen — irgendeine Gesetzmäßigkeit läßt sich nicht feststellen — wird man verschieden zusammengesetzte Kulturen erhalten, die zur Zersetzung verschieden lange Zeit gebrauchen. So kam es vor, daß die Zersetzung manchmal erst nach einem Monat eintrat, manchmal überhaupt nicht. Durchschnittlich begann die Zersetzung nach 7—20 Tagen, selten schon nach 3 Tagen und dann auch nicht regelmäßig, wie es Clausen angibt, der für 6 Passagen einer Kultur insgesamt nur 18 Tage brauchte. Bei Kulturen mit „Stecknadelformen" (d. h. sehr schlanken Plektridienformen mit endständiger, runder Spore, die dem B. Omelianskii gleichen, Abb. 4) fand ich stets Inkubationszeiten von mindestens 7, meistens jedoch 10—20 Tagen. In Passagen, die nur 3 Tage brauchten, herrschte gewöhnlich ein Sporenbildner mit ovaler Spore vor, der sich deutlich mit Jodlösung rot bis gelbbraun färbt und dem von Khouvine isolierten Zellulosezersetzer sehr ähnlich sieht (Abb. 1 und 2).

Wenn wir uns die „Fraßbetten"-Bilder an natürlichen Zellulosen von Henneberg (12, 13, 14), Haberlandt (10, 11) und Baker (1, 2) u. a. aus dem Darmtraktus verschiedener Tiere, aus Düngerrotte und Kompost ansehen, so wird uns klar, daß auch für die anaerobe Zellulosezersetzung eine größere Anzahl verschiedener Organismen verantwortlich ist. Je nach den gerade herrschenden Umständen wird der eine oder andere Organismus in den Vordergrund treten. Durch die elektiven Nährmedien nach Omelianski werden wahrscheinlich nur die wenigsten Zellulosezersetzer angereichert (z. B. werden nur angereichert die Zersetzer von Omelianski,

Werner und Khouvine). Omelianski schreibt selber, daß es eine sichtliche Übertreibung wäre, diese Mikroben für die einzigen Zerstörer der Zellulose in der Natur zu halten.

Daß die jeweils herrschende Begleitflora einen wesentlichen Einfluß ausübt, deutete ich schon am Anfang dieser Ausführung an. Auch ist es gewiß nicht gleichgültig, wann die Überimpfung aus der alten Kultur in die neue Kultur erfolgt. Nach dem Gesagten ist es fast unmöglich, an solchen Anreicherungskulturen irgendwelche Gesetzmäßigkeiten festzustellen. Man darf sich daher nicht wundern, wenn man mehrere Passagen hindurch immer denselben Organismus im mikroskopischen Bild als vorherrschend festgestellt hat und dieser dann in den folgenden Anreicherungen mehr und mehr verschwindet.

Die oben aufgezählten Nährlösungen eigneten sich fast alle gleich gut, mit Ausnahme der Nährlösung von Bokor, mit der niemals anaerob eine Zersetzung erzielt wurde.

Um einige Beispiele zu geben: Es wurden angereichert aus

Rinderpansen: Vorwiegend Stecknadelformen. Die Inkubationszeiten waren extrem lang, man muß gerade bei Beimpfung mit Panseninhalt sehr viele Kulturen ansetzen, da nur sehr wenige angehen.

Meerschweinchenblinddarm: Bazillus mit endständiger Anschwellung, die sich mit Jodlösung rot bis braungelb färbt (vgl. oben), und Stecknadelformen. Die Zersetzung setzt sehr schnell und sehr regelmäßig ein, das Filtrierpapier wird sehr bald intensiv gelb gefärbt.

Mensch: Vorwiegend Stecknadelformen.

Pferd: Meist Stecknadelformen, daneben sehr lange Stäbchen mit endständiger ovaler Anschwellung, die eine runde Spore enthält. Des öfteren wurden Involutionsformen beobachtet, wobei Bilder auftraten, die Tetrault mit der Zygosporenbildung der Zygomyzeten vergleicht. Der Vorgang ist natürlich so, daß das Stäbchen zunächst in der Mitte anschwillt und sich dann teilt, ein Vorgang, der mit Kopulation überhaupt nichts zu tun hat. Diese Formen färbten sich mit Jodlösung ebenfalls gelb bis rot. Sie treten gewöhnlich noch in einigen weiteren Passagen auf, verlieren sich aber mit der Zeit.

Schaf: Lange und kurze Stecknadelformen und solche mit ovaler Spore, daneben Bakterien, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Amylobacter navicula haben, aber kleiner sind. Auch hier traten gelegentlich Involutionsformen auf.

Breifaulen Kartoffeln: Stecknadelformen. Mehrere Passagen hindurch ließen sich eigentümliche, auffallend dicke runde Involutionsformen (?), die sich partiell mit Jodlösung rot färbten, beobachten. Daneben schlanke Formen, die sich ebenfalls mit Jod deutlich färben ließen.

Tümpelschlamm und zersetztes Papier aus einem großen Teich mit Brackwasser (dem „kleinen Kiel"): Stecknadelformen und kleine Naviculaform. Das Filtrierpapier wurde in eine dickschleimige Substanz verwandelt. Die einzelnen Fasern waren dicht mit Bakterien bedeckt und zwar in viel stärkerem Maße, als es sonst bei guten Zersetzungen mit Stecknadelformen zu sein pflegt. Besonders die Bakterien, die der Faser direkt auflagen, färbten sich mit Jodlösung weinrot. Durch Erhitzung auf 80° 10 Min. wurden diese Formen abgetötet.

Röstwasser: Neben Stecknadelformen vorwiegend ein Langstäbchen mit endständiger ovaler Anschwellung, der vielfach noch eine Spitze

aufsaß, einer Helmspitze ähnlich. Häufig war das Stäbchen leicht gewunden. Der Organismus hat große Ähnlichkeit mit der aus dem Meerschweinchenblinddarm isolierten Form, wird ebenfalls mit Jod in gleicher Weise gefärbt, nur daß er wesentlich größer ist.

2. Reinzüchtungsversuche mit der Plattenmethode.

Glaubte ich, auf Grund des mikroskopischen Bildes in erster Linie, Anreicherungskulturen von genügender Reinheit vor mir zu haben, so goß ich hiervon anaerobe und aerobe Platten entweder direkt oder nach den Angaben Clausens, nach einer vorherigen Passage in Zellulose-Leber-Bouillon. Außer den Standardnährböden wurden verschiedene Spezialnährböden angewendet, wie sie in der Literatur für Zellulosezersetzer angegeben werden (besonders solche mit gefällter Zellulose), vor allem aber der Bouillon-Asparagin-Agar Clausens. Die Verdünnungen wurden in letzter Zeit mit sog. Verdünnungsflaschen ausgeführt. Die Verdünnungsflasche bietet den Vorteil, daß man das in Zersetzung begriffene Papier durch intensives Schütteln im Wasser verteilen und die an den Fasern haftenden Organismen gut herunterschütteln kann. Sollte das Material vorher erhitzt werden, so geschah das in einem Röhrchen mit sterilem Wasser, dessen Inhalt dann in die Verdünnungsflasche geschüttet wurde. Für anaerobe Kulturen wurde der Agar vorher etwa 15 Min. gekocht, um die absorbierte Luft herauszutreiben, und dann auf 47—50° abgekühlt, bevor er in die Platten ausgegossen wurde, um die Bildung von Kondenswasser weitgehendst zu vermeiden. Da trotz aller Vorsichtsmaßregeln gelegentlich doch Kondenswasserinfektion eintritt, ist es vorteilhaft, die Einmachegläser vorher mit Formalin zu desinfizieren. Das gilt ganz besonders für Röhrchenkulturen, die man längere Zeit im Weckglas bebrüten will. Das Wasser der Nährlösung verdunstet infolge des Vakuums besonders leicht, schlägt am Deckel des Weckglases nieder und tropft auf die Stopfen der Röhrchen herunter. Sind die Einmachegläser vorher desinfiziert, so wird die Zahl der Kondenswasserinfektionen auf ein Minimum heruntergedrückt. Es ist unbedingt erforderlich, nach der Behandlung mit Formalin die Gläser gut auszuspülen, damit alles Formalin entfernt wird. Die Trocknung der Gläser erfolgt am besten in einem Trockenschrank. Im übrigen wurde verfahren, wie Clausen es für die Weckglasmethode angibt. Frühestens nach 6 Tagen wurden die Kulturen untersucht.

Als Nährlösung diente anfangs die Nährlösung 13, die in den Anreicherungskulturen vorwiegend verwendet worden war. Später wurden außerdem Bouillonnährlösungen verwendet. Mit ihnen sollte versucht werden, eine Zersetzung auch ohne Symbionten zu erreichen. Zur Anwendung der Bouillonlösungen kam ich durch die folgenden Überlegungen.

Wenn in einer bestimmten Nährlösung, also z. B. in der Nährlösung 13, die Zellulosezersetzer wachsen, so müßten sie eigentlich auch auf einem festen Nährboden wachsen, der die gleiche Zusammensetzung hat, und dem Zellulose in fein verteilter Form (chemisch reine Zellulose oder gefällte Zellulose) beigegeben wurde. Ein Wachstum anaerober Zellulosezersetzer auf solchen Nährböden habe ich ebensowenig wie Clausen, Simola (31) und Cowles und Rettger erzielen können. Der Grund hierfür liegt in der Tatsache, daß der Zellulosezersetzer ohne Symbionten in solchen Nährlösungen keine Zellulose angreift. Nun gelang es Clausen aber, anaerobe Zellulosezersetzer auf festen Nährböden mit Fleischwasser zu

züchten. Es schien also, daß die Zellulosezersetzer, die nach den Angaben von Clausen sonst streng an das Vorhandensein von Zellulose gebunden sind, hier auch ohne Zellulose wachsen können. Weiter zersetzten die so erhaltenen Kulturen (B. Omelianskii) Zellulose in der anorganischen Nährlösung 4 von Clausen mit Asparagin nur in Symbiose mit B. putrificus. Eine Klärung dieser Symbioseverhältnisse ist Clausen nicht gelungen. M. E. war folgende Erklärung möglich: Der Zellulosezersetzer ist entweder strikt an den Symbionten gebunden, oder aber der Symbiont macht dem eigentlichen Zellulosezersetzer bestimmte Stoffe verdaulich, er schließt sie auf. Die negativen Ergebnisse Clausens in dieser Richtung brauchten die letztere Vermutung noch nicht umzustoßen. (Er ließ die Nährlösung 4 erst durch B. putrificus vorverdauen, sterilisierte dann wieder und beimpfte mit dem Zellulosezersetzer.)

Nahm ich also an, dem Zellulosezersetzer müßten gewisse Stoffe erst aufgeschlossen werden, so könnte es möglich sein, den Bakterien diese Stoffe gleich fertig aufgeschlossen zu reichen; mit anderen Worten, man könnte dann den Symbionten ausschalten. Solch einem „aufgeschlossenen" Stoff schien der Bouillon-Asparagin-Agar Clausens zu entsprechen. Ich wählte als Nährlösung für reingezüchtete Bakterien die Substanzen des Bouillon-Asparagin-Agar, also Fleischwasser, Asparagin, Pepton und Kochsalz (Nährlösung 12) im Röhrchen mit einem Streifen Filtrierpapier. In der Tat erhielt ich in dieser Nährlösung mit dem noch zu beschreibenden aeroben ovalen Sporenbildner Zersetzung des Filtrierpapiers ohne den Symbionten. Als ich dann später die Arbeit von Cowles und Rettger erhielt, übernahm ich deren Fleischwasser (Rindfleischwasser, Pepton, K_2HPO_4), da es sich herausstellte, daß in dieser Nährlösung (Nährlösung 14) die Zersetzung schneller vonstatten ging.

Als Kriterium für die Zellulosezersetzung galt mir das „Welkwerden" mit darauffolgendem Zerfall von Filtrierpapierstreifen in Röhrchen, entsprechend dem Zerfallsbild in den Anreicherungskulturen. Wie weit man mikroskopisch an den Fasern des Filtrierpapiers eine Zersetzung erkennen kann, werde ich weiter unten noch zu beschreiben haben. Häufig wurden die Symbioseversuche auch in den kleinen Einmachegläsern zu $^1/_{10}$ und $^1/_4$ l Fassungsvermögen vorgenommen, da in den Reagenzgläsern, die bei anaerober Bebrütung zu mehreren in einem größeren Einmacheglas evakuiert wurden, andere Bedingungen herrschen konnten. In dahingehenden Parallelversuchen konnte jedoch kein Unterschied nachgewiesen werden.

Es gelang mir anfangs nur selten, Sporenbildner mit endständiger runder Spore, also Bazillen, die dem B. Omelianskii ähneln, nach den Angaben von Clausen zu isolieren, und dann konnte ich mit diesen Organismen nie Zersetzungen des Filtrierpapiers erzielen. Ich führte das zunächst darauf zurück, daß ich vielleicht gar keine „Omelianskikulturen" vor mir hatte. Darum mußte ich mit den verschiedensten Nährböden versuchen, ob ich nicht den Zellulosezersetzer meiner Kulturen isolieren könnte. Da es durchaus möglich war, daß bestimmte Symbiosen vorlägen und darauf das Scheitern aller bisherigen Isolierungsversuche zurückzuführen sei, mußte ich sämtliche Organismen, die ich durch die Plattenmethode und zwar mit den verschiedensten Nährböden anaerob und aerob nur irgendwie erhalten konnte, daraufhin prüfen, ob sie Zellulose einmal allein und zweitens in Symbiose mit den übrigen Organismen anzugreifen imstande wären. Als Symbiont waren besonders B. putrificus (nach den Angaben Clau-

sens) und Bact. coli zu berücksichtigen. Bact. coli sowie seine atypischen Formen fanden sich stets in den unerhitzten Anreicherungskulturen vor. Sie spielen unter natürlichen Verhältnissen im Darm bekanntlich eine große Rolle. Im Gegensatz zu Clausen fand ich in meinen Kulturen nur ganz selten B. putrificus. Das ist jedenfalls auch der Grund, weswegen ich mit der Passage in Zellulose-Leber-Bouillon so schlechte Erfolge hatte.

Es würde zu weit führen, wollte ich hier alle Isolierungen und Symbioseversuche aufzählen, die ich gemacht habe, und die alle zu keinem positiven Ergebnis führten. Ich will hier nur die Versuche herausgreifen, zu denen anaerobe Sporenbildner mit runder, endständiger Spore verwendet wurden. Der Einfachheit halber habe ich diese Sporenbildner im folgenden als „Stecknadelform" wegen ihres Aussehens bezeichnet und meine damit eine Gruppe morphologisch ähnlicher Formen. Vorher möchte ich jedoch noch auf eine Reihe von Versuchen eingehen, die ich mit dem schon öfter erwähnten aeroben Sporenbildner, ebenfalls einer Plectridienform, machte.

a) Isolierung einer plektridienförmigen Art (Macerans-Gruppe).

Neben der Stecknadelform beachtete ich besonders Bact. coli und diese Plectridienform, da beide ziemlich regelmäßig in den Anreicherungen anzutreffen waren. Da Bact. coli im Darm eine große Rolle spielt, war es durchaus möglich, daß es auch irgendwie an der Zellulosezersetzung beteiligt ist. Nun erhielt ich mit Bact. coli aus meinen Anreicherungen auf festen Nährböden mit gefällter Zellulose gelegentlich Hofbildung, so daß ich vermutete, dieser Organismus zersetzte selbständig Zellulose. Da mit Bact. coli — gleiche Resultate erhielt ich auch bei einem Streptokokkus — mit den üblichen Nährlösungen für Zellulosezersetzer eine Zersetzung des Filtrierpapiers nicht eintrat, glaubte ich, daß diese künstlichen Nährlösungen in ihrer Zusammensetzung unvollständig seien, und daß man versuchen müsse, einen Nährboden zu schaffen, der den natürlichen Verhältnissen möglichst weitgehend entspräche. Am naheliegendsten schien mir ein Pansenextrakt, der auf verschiedene Art gewonnen und mit verschiedenen Zusätzen versehen wurde. Insgesamt wurden 9 verschiedene Nährlösungen ausprobiert. Doch nirgends zeigte sich eine Zersetzung. Auch die Verwendung von Salat, Weißkohl, Stroh, Gerstenspelzen und Lindenholz unter verschiedenen Bedingungen ergab keine Zersetzung. Die Hofbildung kam also nicht durch Zelluloselösung, sondern durch eine Ausfällung irgendwelcher Kristalle im Nährboden zustande, wobei um die Kolonie herum eine klare, durchsichtige Zone bleibt, während der übrige Agar getrübt erscheint.

Als Zellulosezersetzer kommt Bact. coli nicht in Frage. Es konnte aber noch als Symbiont eine Rolle spielen. Das konnte auf zwei Wegen geprüft werden; einmal durch Erhitzen der Anreicherungskulturen, um Bact. coli auszuschalten, so daß evtl. keine Zersetzung in den Kulturen mehr eintrat, zum anderen durch Symbioseversuche mit den Bakterien, die ich mit Hilfe der Plattenmethode isoliert hatte.

Die Lösung dieser Frage durch Erhitzungsversuche an den Anreicherungskulturen mußte ich aufgeben. Es stellte sich nämlich nur heraus, daß in den erhitzten Kulturen die Zersetzung erst später eintrat als in den unerhitzten, was sich u. a. durch eine allgemeine Schwächung der Bakterien erklären

läßt. Die Anreicherungskulturen sind in ihrer Zusammensetzung noch derartig vielseitig, daß es gar keine Rolle spielt, wenn man den einen Symbionten, also hier Bact. coli, ausschaltet, es sei denn, man hat schon Anreicherungen von derartiger Reinheit, daß in ihnen nur Bact. coli und der eigentliche Zellulosezersetzer enthalten sind. Das war hier jedoch nicht der Fall.

Die Symbioseversuche mit Bact. coli und der Plectridienform brachten dann sehr interessante Ergebnisse. Die Plectridienform (Abb. 3) hatte ich früher schon öfter isoliert aus Lösungshofkolonien (siehe oben) auf festen Nährmedien mit Zellulosezusatz und auf Bouillon-Asparagin-Agar. Die Ausgangskulturen stammten aus Material, das bei einer Pektingärung gewonnen wurde, und aus einem Meerschweinchenblinddarm.



Abb. 3.

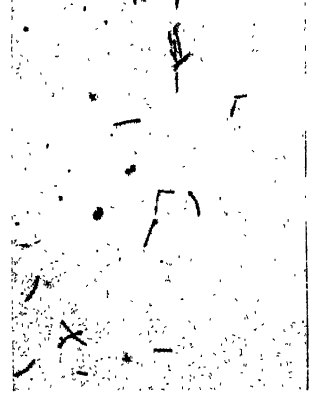


Abb. 4.

Abb. 3. Plectridienform aus der Bac. macerans - Gruppe. Bouillon-Agar. Mit wässerigem Methylenblau gefärbt. Vergr. 500×.

Abb. 4. Stecknadelform mit runder Spore. Bouillon-Asparagin-Agar. Mit wässerigem Methylenblau gefärbt. Vergr. 500×.

Nach 1monatlicher und teilweise längerer Bebrütungszeit zeigte diese Plectridienform in eiweißfreier Nährlösung mit Filtrierpapier und Salat eine Zersetzung in Symbiose mit Bact. coli und einem Streptokokkus, der nicht bestimmt wurde. In Bouillon-Asparagin-Lösung (Nährlösung 12) erfolgte die Zersetzung auch ohne Symbionten. Anfangs habe ich diese Ergebnisse nur wenig beachtet, da die Zersetzungszeiten (1 Monat und länger) im Vergleich zu denen der Anreicherungskulturen viel zu lang waren. Das Zersetzungsbild schien mir auch nicht typisch genug zu sein. Zwar zerfielen die Filtrierpapierstreifen in lauter kleine Fasern, aber es trat keine so deutliche und gänzliche Auflösung der Zellulose ein, wie ich sie gerade in dieser Zeit an den Anreicherungen aus Meerschweinchen-Blinddarm erlebt hatte. Als sich dann aber die Zersetzungsbilder am Filtrierpapier häufiger zeigten, und auch eine gewisse Gesetzmäßigkeit auftrat, habe ich diesen Organismus etwas genauer beachtet. Ich stellte fest, daß man an den Fasern des durch diesen Organismus zersetzten Filtrierpapiers deutlich Veränderungen erkennen kann. An Hand einiger photographischer Aufnahmen aus Roh- und Reinkulturen will ich das auseinandersetzen.

Abb. 5 zeigt eine Faser von einem unzersetzten Filtrierpapier. Die Fasern sind glatt und zeigen keinerlei Korrosionserscheinungen. Abb. 8 zeigt ein Präparat, das aus einer Kultur der Plectridienform mit einem Symbionten gewonnen wurde. Wir sehen hier deutlich, wie aus der Zellulosefaser bestimmte Teile herausgelöst sind und nur ein Gerust zuruckbleibt. Abb. 7 aus einer Rohkultur zeigt sehr schon den Beginn einer solchen Korrosion. Ähnliche Abbildungen finden wir in den Arbeiten von van Iterson (16). Gescher (9) u. a. Es lassen sich noch beliebig weitere Zwischenstücke in der Zersetzung vorweisen. Ich habe mit Absicht sowohl Abbildungen von Roh- als auch von Reinkulturen zusammengestellt, denn der Beginn der Zersetzung ist in beiden Fällen gleich. Makroskopisch wird erst das Filtrierpapier „welk", dann lösen sich einzelne Fasern ab und schließlich sinkt es zusammen (Abb. 9). Bei den Rohkulturen mit sehr guter Zersetzung wird das Filtrierpapier völlig aufgelöst. nur ein ganz geringer Rückstand bleibt. Bei Reinkulturen mit der Plectridienform — übrigens auch bei den meisten Rohkulturen, wo die Stecknadelform



Abb. 5. Zellulosefaser unzersetzt. Vergr. 500×.



Abb. 6. Gute Zersetzung der Zellulosefaser durch eine Rohkultur. Vergr. 200×.



Abb. 7. Beginn der Zersetzung (Rohkultur). Vergr. 500×.

vorherrscht — geht die Zersetzung im Höchstfalle bis zum Zusammenfallen des Filtrierpapiers. Mikroskopisch betrachtet, geht die Zersetzung auch nur bis zu einem bestimmten Punkt, etwa soweit wie in Abb. 8 (gute Zersetzung in Nährlösung 15 mit Glukosezusatz Plectridienform + B. mesentericus), während sie bei Rohkulturen mit guter Zersetzung weitergeht, wie es Abb. 6 veranschaulichen mag, die alle Übergänge zeigt, von der noch völlig intakten Faser bis zur Faser, von der nur noch winzige Stückchen übriggeblieben sind.

Wir fragen [illegible] kommt es, daß in dem Falle der Zersetzung durch die Plectridienform [illegible] Zersetzung bei einem gewissen Punkte stehenzubleiben scheint. Es kann dies natürlich durch irgendwelche ungünstigen Ernährungsbedingungen oder Stoffwechselprodukte verursacht sein; vielleicht liegt es aber auch in der Struktur der Zellulosefaser begründet. Es ist nicht ausgeschlossen, daß Untersuchungen mit Röntgenstrahlen zur weiteren Klärung dieser Frage und umgekehrt auch zur Strukturfrage der Zellulose beitragen werden im Sinne der Arbeiten von Staudinger, Meyer und Mark (24) u. a. Ich habe später zum Vergleich noch einmal genau die Veränderungen an Salatblättern durch die Plectridienform



Abb. 8.

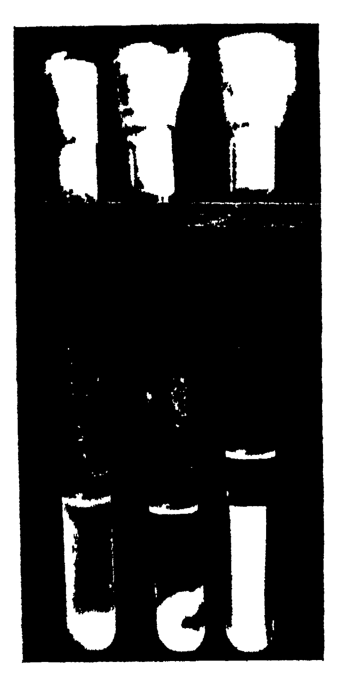


Abb. 9.

Abb. 8. Endstadium der Zersetzung durch die Plectridienform. Symbiont: Bac. mesentericus. Vergr. 1000×.

Abb. 9. Das makroskopische Bild der Zersetzung. Von links nach rechts: 1. Rohkultur, mittlere Zersetzung; 2. Plectridienform, mittlere Zersetzung; 3. Kontrolle.

untersucht. Die Salatblätter wurden erst welk und zerfielen dann mehr und mehr. Unangegriffen blieben nur die Gewebsteile, die Inkrusten enthalten, nämlich Epidermis und Gefäßbündel. Ganz ähnliche Ergebnisse erhielt ich bei einem entsprechenden Versuch mit sterilisierten grünen Pappelblättern, den ich auf einen Vorschlag von Herrn Prof. Henneberg machte, der gleichzeitig über derartige in der Natur vorkommende Erscheinungen an Pappelblättern Untersuchungen anstellte. Auch hier wurden Epidermis und Gefäßbündel nicht angegriffen. Unter einem mäßig starken Wasserstrahl ließ sich aus den Pappelblättern alles bis auf das feine Netzwerk der Gefäßbündel herausspülen. Die Epidermis, die gewissermaßen wie ein Beutel frei um das Ganze herumhing, ließ sich hierbei leicht abstreifen.

Zum Vergleich ließ ich auf die Salat- und Pappelblätter auch solche Anreicherungskulturen einwirken, die Filtrierpapier praktisch restlos abbauen. Das Bild war wieder das gleiche: Epidermis und Gefäßbündel als inkrustierte Teile blieben unversehrt.

Nachdem so die einzelnen morphologischen Veränderungen der Zellulosefaser festgestellt wurden und Filtrierpapier sich als am geeignetsten erwies für einen schnellen und sicheren Nachweis der Zellulosezersetzung, komme ich auf die einzelnen Versuche mit der Plectridienform zurück.

Tab. 1. Zersetzung durch die Plectridienform.

Versuche	N-L 13				N-L 12		N-L 14	
	allein		+ Bact. coli		allein		allein	
	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob
1.	—	—	—	26	—	—	—	18
2.	—	—	—	32	—	32	—	18
3.	—	—	—	39	—	32	40	18
4.	—	—	—	39	—	32	40	18
5.	—	—	—	39	—	—	40	18
6.	—	—	—	30	—	44	—	18
7.	—	—	—	26	—	?	?	18

Die Zahlen geben die Tage an, nach denen zuerst Zersetzung beobachtet wurde.

Es wurden mehrere Stämme isoliert. Sie zeigen (Tab. 1) ohne Symbionten in Nährlösungen mit Fleischwasser (Nährlösungen 12 und 14) eine Zersetzung der Zellulose am schnellsten in der Nährlösung 14 (ohne Asparagin), in anorganischer Nährlösung (Nährlösung 13) Zersetzung nur in Symbiose mit Bact. coli. Es gelingt also, durch eine geeignete Nährlösung den Symbionten überflüssig zu machen. Anaerob trat die Zersetzung meist erst viel später ein, teilweise überhaupt nicht.

Tab. 2. Symbioseversuch.

	N-L 13				N-L 14	
	allein		+ Plectr.-Form		allein	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Plectridienform . .	—	—	—	—	25	—
Streptococc. faecium	—	—	14	—	—	—
Diplococcus	—	—	—	—	—	—
Sarcina lutea . . .	—	—	—	—	—	—
Corynebacterium .	—	—	35	—	—	—
Bact. coli	—	—	25	—	—	—
Bact. aerogenes . .	—	—	35	—	—	—
Bact. vulgare . . .	—	—	25	—	—	—
Bact. herbicola . .	—	—	—	—	—	—
Actinomyces . . .	—	—	—	—	—	—
Bact. fluorescens .	—	—	35	—	—	—
Weinhefe	—	—	25	—	—	—
Stecknadelform . .	—	—	—	—	—	—
Bac. putrificus . .	—	—	35?	—	—	—
Bac. megatherium .	—	—	25	—	—	—
Bac. subtilis . . .	—	—	—	—	—	—
Bac. mesentericus .	—	—	25	—	—	—

Erklärung der Zahlen siehe Tab. 1.

Die weiteren Versuche hatten im wesentlichen den Zweck, eine schnellere und bessere Zersetzung der Zellulose zu erzielen. Es wurde auf zwei Wegen versucht:

1. durch Wahl anderer Symbionten;
2. durch andere Nährböden.

Der Symbioseversuch (Tab. 2) mit einer Reihe von bekannten Bakterien und solchen Mikroorganismen, die aus den Anreicherungen gewonnen wurden, darunter auch Stecknadelformen, erhalten durch Koloniewachstum (vgl. S. 18/19), ergab, daß außer Bact. coli auch noch andere Mikroben zur Symbiose befähigt sind. Die Zersetzungszeiten wurden jedoch nicht wesentlich herabgesetzt und eine weitgehendere Zersetzung trat auch nicht ein.

Die Ergebnisse des Nährbodenversuches sind in Tab. 3 zusammengestellt. Wie schon in früheren Versuchen festgestellt wurde, ist ein einheitlicher Einfluß der Kreide bei der Plectridienform nirgendwo festzustellen. Einmal tritt eine Zersetzung mit Kreide, das andere Mal ohne Kreide ein. In den anorganischen Lösungen erscheint der Zusatz von Asparagin schädlich. Ammoniumsulfat und Harnstoff sind als Stickstoffquelle gleich gut geeignet, nicht ganz so gut Kaliumnitrat. Aus den Reihen mit den organischen Nährlösungen ist ein besonderer Einfluß nicht zu erkennen.

Auffallend ist, daß die Zersetzung in den Nährlösungen 13 und 14, die in anderen Zersetzungsversuchen bislang mit Erfolg angewendet wurden, nur schlecht oder überhaupt nicht eintrat. Auch in anderen Versuchsreihen wurde gelegentlich das gleiche beobachtet.

Eine schnellere oder bessere Zersetzung wurde also auch nicht durch andere Nährmedien erzielt. Nun konnte aber noch die Konzentration der Nährlösungen von Einfluß sein. Das wurde in einem Mengenversuch untersucht.

Es sollte mit ihm gleichzeitig versucht werden, der Symbiosefrage etwas näherzukommen, nämlich: welche Mengen organischer Substanz ausreichen, um die Zellulosezersetzung noch in Gang zu bringen. Es wurden daher Fleischwasserlösungen (nach dem Nährbodenversuch schienen Nährlösung 14 und 22 geeignet) stufenweise von $^{a}/_{1}$—$^{a}/_{100}$ verdünnt (a = normale Konzentration). Weiter mußten, wenn man diese Verdünnung sehr weit trieb, und man der Nährlösung eine anorganische N-Quelle gab, schließlich dieselben Verhältnisse eintreten, wie bei den anorganischen Nährlösungen, nämlich ohne Symbionten keine Zersetzung, mit Symbionten Zersetzung. Dieser Untersuchung galt der Mengenversuch mit Nährlösung 25. Hierbei wurde die Fleischextraktlösung verdünnt, während die Kaliumnitratmenge konstant blieb. Da Glukose bei der Zellulosezersetzung sicher eine Rolle spielt, wurde auch ein Mengenversuch mit Glukose angestellt. Es war denkbar, daß Glukose zur Einleitung der Zellulosezersetzung irgendwie erforderlich ist, vielleicht, daß sie dem Symbionten zur schnelleren Entwicklung verhilft. Als Ausgangslösung wurde die Nährlösung 15 in konstanter Konzentration verwendet, während Glukose in fallender Menge von 0,5—0,005% zugegeben wurde. Es sei betont, daß Nährlösung 15 außer Zellulose keine organischen Stoffe enthält, die als C-Quelle dienen könnten.

Die Ergebnisse sind in den Tab. 4—6 aufgezeichnet. Es ist erstaunlich, welche geringen organischen Mengen ausreichen, um eine symbiontenfreie Zersetzung zu ermöglichen. Bei einigen Stämmen ist bei $^{a}/_{100}$ noch gar nicht einmal die unterste Grenze erreicht. Auf der anderen Seite erwiesen

Tab. 3. Nährbodenversuch.

	N-L 13 $(NH_4)_2SO_4$ Asparagin		N-L 15 $(NH_4)_2SO_4$		N-L 16 Asparagin		N-L 17 Harnstoff		N-L 18 $(NH_4)_2SO_4$ Harnstoff		N-L 19 KNO_3		N-L 20 KNO_3 Asparagin		N-L 21 KNO_3 Harnstoff	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Plectridienform . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Bact. coli . . .	—	—	25	35	—	35?	25	30	25	25	35	35	—	—	25	25

Tab. 3 (Fortsetzung).

	N-L 22 Fleisch-extrakt (Liebigs) Pepton		N-L 23 Fleisch-extrakt (Liebigs)		N-L 24 Pepton		N-L 25 Fleisch-extrakt (Liebigs) KNO_3		N-L 26 Fleisch-extrakt (Liebigs) Pepton K_2HPO_4		N-L 14 Fleisch-wasser Pepton K_2HPO_4		N-L 27 nach Löhnis Thomas-mehl		N-L 28 nach Fred und Waksmann Medium 88		N-L 29 nach Tetrault Medium C	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Plectrid.-Form	25	35	25	30	25	—	35	25	30	35	35	—	30	25	—	30	35	35
+ Bact. coli . .	—	—	35	35	—	—	35	35	—	—	—	—	30	35	30	30	25	35

Erklärung der Zahlen siehe Tab. 1. a ohne Kreide, b mit Kreide.

sich die hohen Konzentrationen teilweise als unvorteilhaft für die Zersetzung. Es ist nun interessant, daß das Konzentrationsoptimum für die an sich gleichartigen Stämme verschieden ist, teilweise in Abhängigkeit von der Vorzüchtung. Wir können daraus möglicherweise schließen, daß für die Zersetzung der physiologische Zustand der Zellen irgendwie von Bedeutung ist, mag er durch Vorzüchtung, Alter der Kultur oder sonstwie verändert sein. So erscheinen mir auch die vorhin erwähnten Unregelmäßigkeiten etwas verständlicher.

Tab. 4. Mengenversuch.

	N-L 14 nach Cowles und Rettger					
	a/1	a/2	a/5	a/10	a/50	a/100
Plectridienform 1	—	36	55	26	26	26
+ Bact. coli	—	—	—	26	55	—
+ Bac. mesentericus . .	—	—	—	—	26	36
Plectridienform 2	—	55	55	26	36	36
+ Bact. coli	—	26	36	26	26	26
+ Bac. mesentericus . .	—	55	55	55	36	26
Plectridienform 2 . . . . (vorgezüchtet a. Kartoffel)	26	26	36	—	26	—
+ Bact. coli	—	—	—	—	36	55
+ Bac. mesentericus . . .	—	55	55	55	55	—
Plectridienform 3	36	26	—	36	—	—
+ Bact. coli	—	—	—	36	36	55
Plectridienform 3 . . . . (vorgezüchtet a. Kartoffel)	—	—	—	—	55	55
+ Bact. coli	—	—	—	36	36	55

Erklärung der Zahlen siehe Tab. 1.

Tab. 4 (Fortsetzung).

	N-L 22 Gewöhnliche Bouillon					
	a/1	a/2	a/5	a/10	a/50	a/100
Plectridienform 1	26	26	26	26	26	26
+ Bact. coli	—	—	—	26	26	55
+ Bac. mesentericus . .	—	—	36	—	55	36
Plectridienform 2	36	36	36	36	55	55
+ Bact. coli	—	—	36	26	26	55
+ Bac. mesentericus . .	—	—	55	26	36	55
Plectridienform 2 . . . . (vorgezüchtet a. Kartoffel)	—	—	55	36	—	36
+ Bact. coli	—	—	26	26	55	36
+ Bac. mesentericus . .	—	—	—	—	55	—
Plectridienform 3	55	26	36	55	—	—
+ Bact. coli	—	—	—	—	—	—
Plectridienform 3 . . . . (vorgezüchtet a. Kartoffel)	55	36	36	—	—	—
+ Bact. coli	36	—	—	36	—	—

Erklärung der Zahlen siehe Tab. 1.

Das Ergebnis des Mengenversuches mit der Nährlösung 25 (Tab. 5) entspricht einigermaßen den Vermutungen. Hier ist infolge der geringen Menge organischer Substanz (nur 0,5% Fleischextrakt in der Normallösung)

die untere Grenze erreicht: In den Verdünnungen $^{a}/_{50}$ und $^{a}/_{100}$ tritt nur in Gegenwart von Symbionten Zersetzung ein. Der Symbiont bietet dem Zellulosezersetzer aus der anorganischen N-Quelle einen Stoff (als Stoffwechselprodukt, Autolysat usw.), der entweder in den Fleischwasserlösungen (auch in Pepton, vgl. Nährbodenversuch Tab. 3) enthalten ist, oder, was wahrscheinlicher ist, selbst ein organischer Stoff, voraussichtlich stickstoffartiger Natur, ist. Der Zellulosezersetzer braucht also offenbar zur Zersetzung wenigstens kleine Mengen organischer Stoffe.

Tab. 5. Mengenversuch.

	N-L 25 (Liebigs Fleischextrakt, KNO_3 konstant)					
	a/1	a/2	a/5	a/10	a/50	a/100
Plectridienform 2	26	26	36	36	—	—
+ Bact. coli	55	36	36	55	55	—
+ Bac. mesentericus . .	36	55	—	55	55	55
Plectridienform 2 . . . . (vorgezuchtet a. Kartoffel)	26	26	36	55	—	—
+ Bact. coli	55	36	36	55	55	55
Bac. mesentericus	—	—	36	55	55	55

Erklarung der Zahlen siehe Tab. 1.

Es ist nun die Frage, woher bezieht der Symbiont in diesen Fällen und ebenso in anderen streng anorganischen Nährlösungen (z. B. Nährlösung 15, Tab. 3) die C-Quelle? Wir können nach den Ergebnissen der Mengenversuche vermuten, daß die wenn auch nur geringen Mengen organischer Stoffe, die bei der Beimpfung, sei es vom Nährboden, sei es als Autolysat usw., mit in die anorganische Nährlösung gelangen, genügen, um den Symbionten zur Entwicklung zu bringen. Dieser scheidet irgendwelche Stoffwechselprodukte aus, die den Zellulosezersetzer zur Zellulosezersetzung befähigen. Bei der Spaltung der Zellulose entstehen dann Kohlehydrate, die der Symbiont als C-Quelle ausnutzen kann, und so geht der Zyklus weiter. Ich komme gelegentlich der Besprechung der ähnlich liegenden Symbioseverhältnisse bei der Stecknadelform noch einmal auf diese Frage zurück.

Tab. 6. Mengenversuch N-L 15 + Glukose.

	3,5%		0,1%		0,05%		0,01%		0,005%	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Plectridienform 1	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Bact. coli	—	—	—	55	26	26	26	36	26	36
Bac. mesentericus	—	26	26	26	26	26	—	26	26	36
Plectridienform 2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Bact. coli	—	55	—	55	26	55	—	36	36	36
+ Bac. mesentericus	—	26	26	36	—	—	36	36	—	36
Plectridienform 3	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
+ Bact. coli	—	—	—	36	36	26	26	36	36	36

Erklarung der Zahlen siehe Tab. 1. a ohne Kreide, b mit Kreide.

Es war weiter möglich, daß Glukose zur Einleitung der Zelluloselösung dienen konnte, entweder als organischer Stoff direkt für den Zellulosezersetzer, oder als C-Quelle für den Symbionten. Das erstere ist nicht der

Fall, eine symbiontenfreie Zersetzung trat nicht ein (Tab. 6). Für die Zersetzung mit Symbionten erweist sich ein geringer Glukosezusatz dagegen als günstig. Nach 26 Tagen begannen die meisten Zersetzungen in den Reihen mit 0,05 und 0,01% Glukose.

Überblicken wir einmal den Mengenversuch in seiner Gesamtheit, so müssen wir feststellen, daß durch ihn eine bessere und schnellere Zersetzung ebensowenig wie bei den übrigen Versuchen eingetreten ist.

Die Plectridienform gehört wohl sicher in die B. macerans-Gruppe. Auffallend ist ihr üppiges Wachstum in Nährlösungen mit Cellobiose, Stärke oder Inulin. Im folgenden sei der Organismus kurz beschrieben. Der Bazillus ist ein dünnes Langstäbchen und in den ersten Stadien beweglich. Er bildet endständige ovale Sporen aus, die sich außen mit wässerigem Methylenblau färben lassen (Abb. 3). Lackmusmilch wird reduziert und unter leichter Gasbildung dickgelegt. Rohe Kartoffelkeile werden unter Gasbildung zersetzt (Pektin-Gärung). Auf gekochten Kartoffeln wächst der Organismus in dickem, weißgrauem Belag, wobei ein leicht aromatischer Geruch wahrnehmbar ist. Zur Prüfung der Azetonbildung wurde der Organismus in Maische gezüchtet und die Maische nach 8tägiger Bebrütung einer Destillation unterzogen. Das Destillat wies ebenfalls einen leicht aromatischen Geruch auf, gab aber mit Nitroprussidnatrium nur eine sehr schwache Rotfärbung, so daß die Azetonbildung also fraglich ist. Indol wird nicht gebildet. Von 5 Stämmen reduziert einer Nitrat zu Nitrit. Auf Bouillon-Agar wächst der Organismus in runden, grauen, durchsichtigen Kolonien, auf Schräg-Agar ist das Wachstum infolge der schwachen Färbung nur schwer zu erkennen, aber vorhanden. Auf Traubenzucker-Bouillon-Agar und Milchzucker-Bouillon-Agar ist das Wachstum bedeutend besser, bei Zusatz von Chinablau ist der Agar deutlich blau gefärbt. Auf Traubenzucker-Bouillon-Agar erfolgt die Sporenbildung erst sehr spät; typisch ist hier ein mehr fädiges Wachstum. Bouillon wird getrübt und mit der Zeit bildet sich ein schleimiger Bodensatz. Der Bazillus ist fakultativ anaerob.

b) Isolierung einer stecknadelförmigen Art.

Nach vielen vergeblichen Versuchen gelang es, auch die Stecknadelform (Abb. 4) zu isolieren, und zwar aus Rohkulturen, die als Symbiont vorwiegend Bact. coli, also einen hitzeempfindlichen Symbionten, enthielten. Die Stecknadelform wächst nämlich verhältnismäßig spät auf festen Nährböden an, nach 4—5 Tagen sind die Kolonien gewöhnlich erst zu beobachten (auch in Nährlösung tritt die Zersetzung erst nach 6 bis 8 Tagen in Erscheinung), während die Begleitorganismen wesentlich schneller anwachsen und so die Stecknadelform gar nicht zur Entwicklung kommen lassen, selbst wenn sie in der Minderzahl sind. Man muß also die Begleitorganismen zurückdrängen, was bei Sporenbildnern bisweilen sehr schwierig ist. Clausen gelang es, aus Rohkulturen, die zu 75% die Stecknadelform und zu 25% B. putrificus enthielten, durch eine Passage in der Zellulose-Leber-Bouillon die Stecknadelform soweit zu begünstigen — so scheint mir Clausens Maßnahme erklärbar zu sein —, daß B. putrificus und die übrigen Begleitorganismen nicht mehr so stark in den Vordergrund treten konnten.

Doch auch unter diesen Bedingungen wurde nicht regelmäßig ein Koloniewachstum auf Bouillon-Asparagin-Agar erzielt, selbst bei Ausgangs-

kulturen, die die Stecknadelform in sehr großer Menge enthielten. Trotz der sehr großen Zahl der Versuche mit solchen Kolonien erhielt ich nur ganz selten eine Zersetzung der Zellulose. Die Zersetzung trat im Höchstfalle in 2% der angestellten Versuche ein. Wurden die Kolonien mehrmals über die Platte geschickt, so trat durch diese Formen nie mehr eine Zersetzung ein. Es sei betont, daß zur Beimpfung stets die ganzen Kolonien verwendet wurden, wie es Clausen angibt. Es wurden zunächst die verschiedensten Organismen, die aus den Rohkulturen isoliert wurden, als Symbionten untersucht, dann eine Reihe von Sammlungsstämmen. Weiter wurde versucht, eine Zersetzung der Zellulose zu erzielen unter Verwendung von verschiedenen Nährböden (u. a. auch Erdextrakt), in verschiedener Konzentration (wie bei der Plectridienform), durch verschiedene Vorzüchtung (Zellulose-Leber-Bouillon), durch Zugabe lebender und toter Hefen (als Vitamin) und schließlich durch „natürliche" Zellulose (Salat und Pappelblatt). Trotzdem trat nur ganz selten eine Zersetzung ein. Es ist überflüssig, alle Versuche einzeln aufzuzählen.

Zur Klärung dieser vielen Mißerfolge konnten folgende Punkte dienen:

1. Der Zellulosezersetzer verliert durch die Agar-Passage ganz oder teilweise das Zellulose-Lösungsvermögen.

2. Der eigentliche Zellulosezersetzer wächst überhaupt nicht auf Agar, sondern ist nur als Beimengung in den Kolonien einer morphologisch gleichen Stecknadelform enthalten, die aber keine Zellulose angreift, bzw. er liegt im Agar, der beim Ausstechen der Kolonien mit in die Nährlösung gelangt. Dann würde auch klar, warum Clausen verlangt, daß man unbedingt die ganze Kolonie ausstechen muß. Es ist eben erforderlich, die nicht ausgekeimten Sporen des eigentlichen oder noch nicht geschwächten Zellulosezersetzers mit in die Lösung zu bekommen. Denn es müßte eigentlich gleichgültig sein, ob man ein Viertel oder die ganze Kolonie, ob man, um irgendeine Zahl zu nennen, 1 oder 4 Milliarden Keime aussät. Das scheinen mir auch die Ergebnisse der Reihenversuche (Tab. 7—9) zu zeigen mit Kulturen, die mit dem Ausschneideverfahren gewonnen wurden. Zur Beimpfung wurde eine große Öse voll zersetzten Papiers in 100 ccm Wasser aufgeschwemmt und hieraus je 0,3—0,5 ccm in ein Reagenzglas mit den betreffenden Nährlösungen hineinpipettiert. Die Zahl der eingeimpften Keime war also gewiß nicht so groß, als wenn eine viertel oder ganze Kolonie eingeimpft wurde. Die Zersetzungen erfolgten hier durchaus regelmäßig. In einem zur Klärung dieser Frage angestellten Versuch trat eine Zersetzung noch bis zu einer Verdünnung von 1 : 100 000 ein.

Um entscheiden zu können, welcher der beiden Punkte maßgebend ist, habe ich immer wieder von den positiven Kulturen Platten gegossen. Hierbei legte ich besonderes Augenmerk auf solche Kulturen, die mit „freiem Agar"[1]) beimpft wurden — ich wandte damals schon nebenbei das Ausschneideverfahren an, auf das ich weiter unten noch ausführlicher eingehen

[1]) Während Werner und nach ihm Cowles und Rettger auf den Platten alle Kolonien herausschnitten und nach mehrmaliger Bebrütung den restlichen Agar in die Röhrchen füllten, sparte ich mir das Ausschneiden und verwendete von vornherein Agarstücke, auf denen keine Kolonien gewachsen waren, und nenne sie im folgenden kurz „freier Agar". Es setzt allerdings voraus, daß das Impfmaterial sehr gut im Agar verteilt wird. Zu diesem Zweck hat es sich als vorteilhaft erwiesen, das Impfmaterial in der oben bereits erwähnten Weise in der Verdünnungsflasche mit sterilem Wasser aufzuschwemmen und kräftig durchzuschütteln.

werde —. Wenn nämlich, wie unter Zweitens vermutet, die hier vorliegenden Stecknadelformen in 2 Arten oder Stämme zu scheiden sind, die entweder auf festen Nährböden nicht wachsen und Zellulose angreifen oder auf festen Nährböden wachsen, aber keine Zellulose angreifen, so muß es durch wiederholte Plattenpassage gelingen, beide Arten zu trennen. Henneberg (14) hat entsprechende Verhältnisse bei dem Thermobact. cereale und bei dem Bact. Schüzenbachi beobachtet. Daher wurden zur Plattenanalyse immer die Kulturen herangezogen, die „freien Agar" als Impfmaterial enthielten und damit die zersetzende Form. Aber trotzdem traten auf den Platten wieder vereinzelt Kolonien von Stecknadelformen auf. die die Zellulose bald angriffen, bald wieder nicht.

Anderseits habe ich von den Kolonien mit Stecknadelformen sofort wieder neue Platten gegossen ohne Zwischenpassage in flüssigem Nährmedium. — Es sollte, falls die auf Agar nicht wachsende Form mit in die Kolonien hineingelangt wäre, dieser keine Gelegenheit zur Vermehrung gegeben werden. — Hierbei stellte sich heraus, daß diese Stecknadelform sich beliebig lange auf festen Nährböden, auch auf den Standardnährböden, weiter züchten ließ, wobei sich ein absolut normales Wachstum zeigt. Aber Zersetzungen traten nie mehr auf.

Auf Grund dieser Tatsachen können wir annehmen, daß es sich nicht von vornherein um zwei verschiedene Arten handelt, sondern daß die Stecknadelformen sich ständig aufspalten in zersetzende und nicht zersetzende, aber auf festen Nährböden wachsende Stämme, oder, wenn man keine Aufspaltung bei Bakterien annehmen will, daß die hier untersuchten Stecknadelformen ihr Zersetzungsvermögen verlieren, sobald sie auf festen Nährböden gewachsen sind.

3. Reinzüchtung von Stecknadelformen mit dem Ausschneideverfahren.

Nach diesen Ergebnissen war es also bei den mir vorliegenden Stecknadelformen nicht möglich, durch Koloniewachstum zu Reinkulturen mit Zellulosezersetzungsvermögen zu gelangen. Es blieb, wenn man von der Einzellkultur absieht, nur noch der Weg des Ausschneideverfahrens.

Die zum Ausschneideverfahren benutzten Kulturen waren schon ziemlich rein, sie enthielten an Begleitorganismen neben Bact. coli nur noch einen aeroben Sporenbildner, sie entsprechen also wohl den „purified cultures" der Amerikaner. Dieser aerobe Sporenbildner wurde anfangs übersehen. Nach dem Vorgange von Cowles und Rettger wurden solche Kulturen als rein angesehen, bei denen nach Abtötung von Bact. coli keine Zersetzung mehr eintrat. Die genauere Untersuchung ergab aber, daß in solchen Kulturen dennoch ein aerober Sporenbildner als an sich vielleicht harmloser Begleitorganismus vorhanden war. Für genauere Untersuchungen mußte er aber stören. Die Entfernung gerade dieses Sporenbildners machte die größten Schwierigkeiten.

An einigen Beispielen möge das erläutert werden. In einer Plattenanalyse waren bei der ersten Verdünnung nur Colibakterien angewachsen, es hatte also den Anschein, als ob die verwendete Kultur frei von Begleitorganismen sei. Die zweite Verdünnung wies aber neben Bact. coli auch den Sporenbildner auf, der bei der ersten Verdünnung ebenfalls zugegen gewesen sein muß. Das schneller wachsende Bact. coli hatte den Sporenbildner gar nicht erst zur Entwicklung kommen lassen. Die zweite

Verdünnung war dagegen so stark, daß der hemmende Einfluß von Bact. coli nicht ausreichte, den Sporenbildner zu unterdrücken. Die gerade herrschenden Mengenverhältnisse spielen also auch eine Rolle. Auf den aeroben Platten wächst neben Bact. coli nur der Sporenbildner. Wenn man hiervon Kolonien abimpft, bekommt man leicht auch die ruhenden Sporen des nur anaerob wachsenden Zellulosezersetzers mit in die Kultur. Bei Beimpfung eines Röhrchens mit Filtrierpapier mit dem Sporenbildner trat z. B. Zersetzung ein, so daß ich glaubte, es handle sich um einen Zellulosezersetzer. Wie das mikroskopische Bild aber zeigte, war die Zersetzung durch die Stecknadelform erfolgt. — Umgekehrt wächst auf den anaeroben Platten, wenn überhaupt, neben Bact. coli nur die Stecknadelform. Bei Verwendung von „freiem Agar" (und ebenso bei Verwendung von Kolonien mit Stecknadelformen, die nach Clausen mit der Kapillarpipette ausgestochen werden) wird man hier die ruhenden Sporen des aeroben Sporenbildners mit in die Kulturen bekommen, wie die Versuche auch zeigten. Schließlich keimen auch unter aeroben Bedingungen nicht immer alle Sporen des Begleitorganismus aus (vgl. die Unsicherheit beim Sterilisieren von Milch).

Nun zeigte sich, daß bei Anlegung verschiedener Verdünnungen auf den ersten Platten der aerobe Sporenbildner, obwohl kein anderer Organismus zugegen war, nicht anwuchs, wohl aber auf den letzten Verdünnungen. Es mußten also irgendwelche Hemmungsstoffe mit in den Agar gekommen sein, die bei stärkerer Verdünnung nicht mehr in Erscheinung traten, so daß der aerobe Sporenbildner auskeimen und somit erkannt werden konnte. Damit war ein neuer Weg zur Reinzucht gewiesen. Eine gut zersetzende Kultur, in der im mikroskopischen Bilde die Stecknadelform und Bact. coli die Fasern in riesigen Mengen bedeckten, wurde in Verdünnungsflaschen gefüllt, gut geschüttelt und so möglichst viele runde Sporen von den Fasern heruntergeschüttelt. Darauf wurden in fallender Verdünnung Platten angelegt, bebrütet und mit dem „freien Agar" Röhrchen beimpft. Sobald eine Zersetzung eintrat, wurden die betreffenden Röhrchen aus den Weckgläsern genommen — das kann ohne Schaden geschehen, da die Zersetzung auch aerob weitergeht, wenn sie erst einmal im Gange ist — zur Vermeidung von Infektionen durch Kondenswasser, das bei längerem Stehen in den Weckgläsern häufig auf die Röhrchen tropft. Um solche Kulturen, die auch jetzt noch den aeroben Sporenbildner enthielten, leicht erkennen und ausschalten zu können, wurden die Röhrchen aerob weiter bebrütet. Nach 6—8tägiger Bebrütung wurden einfache Platten mit starker Einsaat gegossen und alle Kulturen ausgeschieden, die hier ein Wachstum des aeroben Sporenbildners zeigten. Bei der zweiten Plattenserie wurde die Verdünnungsmethode angewendet; trat dann auf sämtlichen Platten kein Wachstum mehr auf, so wurde diejenige Kultur als rein angesehen, die aus der letzten Verdünnung stammte, in der mit „freiem Agar" noch eine Zersetzung eintrat.

Inzwischen ist eine Arbeit von Snieszko (34) erschienen, in der ein neuer Weg zur Reinzüchtung thermophiler Zellulosezersetzer eingeschlagen wird. Snieszko hatte ebenfalls Schwierigkeiten, sporenbildende Begleitorganismen aus seinen Kulturen zu entfernen. Er geht von folgender Überlegung aus: In Bouillon ohne Zellulose wird der aerobe Sporenbildner günstige Entwicklungsbedingungen vorfinden und auskeimen, während die Sporen des Zellulosezersetzers nicht auskeimen werden. Snieszko beimpfte daher Bouillonröhrchen mit seinen „purified cultures", bebrütete sie bei optimaler Temperatur und pasteurisierte die Kulturen alle 3—5 Std. im Verlauf von 3 Tagen. Auf diese Weise will er allmählich alle Sporen des Begleitorganismus zum Auskeimen gebracht und die vegetativen Keime durch die Erhitzung abgetötet haben, während die Zellulosezersetzer nicht keimten und daher die Erhitzung überstanden.

Es ist allerdings fraglich, ob tatsächlich in allen Fällen alle Sporen des Begleitorganismus ausgekeimt sind. Die oben geschilderten Ergebnisse der eigenen Untersuchungen geben zu diesem Bedenken Anlaß. Man wird auch bei diesem Verfahren von vornherein damit rechnen müssen, daß nur ein gewisser Prozentsatz der Kulturen letzten Endes wirklich frei von Begleitorganismen ist. Es liegt also kein Grund vor, die Methode von Snieszko dem Ausschneideverfahren vorzuziehen.

C. Die Zersetzung der Zellulose durch Reinkulturen.

1. Die Zersetzung mit Hilfe von Symbionten.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Clausen, Cowles und Rettger sowie meinen eigenen Untersuchungen mit der aeroben Zellulose lösenden Plectridienform, wurde auch bei der Stecknadelform gefunden, daß eine Zellulosezersetzung in mineralischer Nährlösung (mit Zusatz von Asparagin) nur in Symbiose mit einem anderen Organismus erfolgte.

Übrigens konnte auch Snieszko mit seinem Zellulosezersetzer eine Zersetzung nur erhalten, wenn er den Kulturen Hefe zusetzte. Ihre Bedeutung sieht er:

1. in der Wiederbeschaffung solcher Bestandteile der Nährlösung, die durch das zweimalige Erhitzen im Autoklaven zerstört wurden;
2. in der Schaffung eines geeigneten Oxydations-Reduktions-Potentials;
3. in der Entfernung der beim Zelluloseabbau intermediär auftretenden Zucker, die für die Zellulosezersetzer schädlich werden könnten.

Die beste Zersetzung erhielt ich bei Verwendung von Bact. coli als Symbionten. Es handelte sich ursprünglich um einen atypisch wachsenden Stamm, später wurden mit gleich gutem Erfolg auch andere Stämme verwendet.

Tab. 7. Symbioseversuch.
Als Zellulosezersetzer: Stecknadelform mit runder Spore.

Symbionten	N-L 13		N-L 15		N-L 15 D		N-L 14	
	aerob	an-aerob	aerob	an-aerob	aerob	an-aerob	aerob	an-aerob
Streptoc. faecium . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. herbicola	—	—	—	—	—	—	—	—
Sarcina lutea	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. coli 1	+	+	—	—	+	+	—	+
Bact. coli 2	—	+	—	—	+	+	—	—
Bact. coli 3	—	+	—	—	+	+	—	—
Bact. aerogenes	—	—	—	—	+	+	—	—
Bact. vulgare	+	+	—	—	+	+	—	+
Bact. fluorescens . . .	—	+	—	+	—	—	—	—
Weinhefe	—	+	—	+	—	+	—	—
Kahmhefe.	—	—	—	—	—	+	—	—
Bac. putrificus tenuis .	—	+	—	—	—	+	—	+
Bac. putrificus verruc. .	+	+	—	+	+	+	—	+
Bac. megatherium . . .	—	—	—	—	+	+	—	—
Bac. subtilis	—	—	—	—	—	—	—	—
Bac. mesentericus . . .	—	—	—	+	+	—	—	+
Bac. mycoides	—	—	—	—	—	—	—	+

Da die verwendeten Symbionten (Clausen: B. putrificus, Cowles und Rettger: Bact. coli, aerogenes und vulgare) anscheinend wenig Gemeinsames haben, lag es nahe, daß auch andere bekannte Organismen zur Symbiose befähigt seien. Die Ergebnisse eines größeren Symbioseversuches (Tab. 7, 8) bestätigten diese Vermutungen. Es scheint hierbei wichtig zu sein, daß auch dem Symbionten günstige Entwicklungsmöglichkeiten geboten werden, damit er seine Fähigkeit, als Symbiont zu fungieren, voll entfalten kann. So trat in Symbiose mit B. subtilis und mycoides eine Zersetzung nur in der Bouillonlösung (Nährlösung 14) ein. Ob die Stecknadelform mit der ovalen Spore (vgl. Abb. 1 und 2) absolut rein gewesen ist, muß ich vorläufig dahingestellt sein lassen. Ich mußte eine Zeitlang das Arbeiten mit diesem Stamm aufgeben, leider

war er später nicht mehr lebensfähig. Immerhin können wir aus der Tatsache, daß ohne Symbionten keine Zersetzung erfolgte, schließen, daß dieser Stamm praktisch einheitlich war bzw. daß etwaige übersehene Begleitorganismen als Symbionten nicht dienen konnten[1]).

Tab. 8. Symbioseversuch.
Als Zellulosezersetzer: Stecknadelform mit ovaler Spore.

Symbionten	N-L 13		N-L 15		N-L 15 D		N-L 14	
	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob	aerob	anaerob
Streptoc. faecium . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. herbicola	—	—	—	—	—	—	—	—
Sarcina lutea	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. coli 1	+	—	—	—	+	—	+	+
Bact. coli 2	+	+	—	—	+	+	+	+
Bact. coli 3	—	+	—	—	+	+	—	+
Bact. aerogenes	+	+	—	—	+	+	—	+
Bact. vulgare	+	+	—	—	+	+	+	+
Bact. fluorescens . . .	+	—	—	—	—	—	—	—
Weinhefe	—	+	—	+	—	+	—	—
Kahmhefe.	+	+	—	—	+	+	—	—
Bac. putrificus tenuis. .	—	—	—	+	?	—	?	—
Bac. putrificus verruc. .	+	+	—	+	+	—	—	+
Bac. megatherium . . .	+	—	—	—	+	—	+	—
Bac. subtilis	—	—	—	—	—	—	+	+
Bac. mesentericus . . .	+	+	—	—	+	+	+	—
Bac. mycoides	—	—	—	—	—	—	+	+

Da, wie schon hervorgehoben, die beste Zersetzung mit Bact. coli erfolgte, wurde in weiteren Versuchen fast ausschließlich dieser Organismus als Symbiont verwendet, um so mehr, als es durch Erhitzen leicht gelingt, ihn auszuschalten, um dann nur die Stecknadelform vor sich zu haben. Bact. coli läßt sich außerdem leicht jederzeit isolieren. Es hat sich nämlich herausgestellt, daß längeres und wiederholtes Fortzüchten auf festen Nährböden die symbiontischen Fähigkeiten offenbar schwächt, was in noch stärkerem Maße z. B. für Hefen gilt.

a) Die Analyse der Symbiose.

Mit folgenden Untersuchungen sollte versucht werden, den Symbiosekomplex zu analysieren. Es wurde mit möglichst einfach zusammengesetzten Nährlösungen gearbeitet. Verwendet wurden:

[1]) Aus dem oben angegebenen Grunde ist es mir nicht möglich, eine abschließende Stellung zu nehmen zu der inzwischen erschienenen Arbeit von Rudolf Meyer (Archiv f. Mikrobiologie. Bd. 5. 1934. S. 157), in der ein Organismus mit endständiger ovaler Anschwellung beschrieben wird und der große Ähnlichkeit mit dieser Form zu haben scheint. Gemeinsam ist beiden Organismen neben der ovalen endständigen Anschwellung, die sich mit Jodlösung gelbbraun färbt, die Bildung eines gelben Farbstoffes, der sich auch auf das Filtrierpapier überträgt, Eigenschaften, die ich bei der „Stecknadelform mit runder Spore" niemals beobachtet habe. Die Reinzüchtungsmethode von R. Meyer (viermaliges Waschen von 0,5—1 g angegriffener Zellulose in sterilem Wasser) läßt nach meinen Erfahrungen Zweifel aufkommen, ob die von ihm beschriebenen anormalen Formen zu ein und demselben Organismus gehören, um so mehr, als ich solche Formen stets nur in Anreicherungskulturen beobachten konnte. Interessant wäre es, wenn es gelänge, mit dem Mikromanipulator isolierte Zellulosebakterien durch Zusatz geeigneter Symbionten in mineralischer Nährlösung zur Zersetzung zu bringen.

1. Die Nährlösung 15, als N-Quelle Ammoniumsulfat und als C-Quelle nur Zellulose.

2. Dieselbe Nährlösung mit Zusatz von Asparagin.

3. An Stelle von Asparagin Glukose.

Der Versuch wurde in kleinen Einmachgläsern zu ¼ l Inhalt angesetzt. Nach Beendigung des Versuches konnte eine klare Staffelung in der Zersetzungsstärke erkannt werden:

In der ersten Reihe, wo außer Zellulose keine C-Quelle vorhanden war; relativ spätes Einsetzen der Zersetzung.

In der zweiten Reihe, außer Zellulose Asparagin als nicht besonders gute C-Quelle; Einsetzen der Zersetzung nach mittlerer Inkubationszeit.

In der dritten Reihe, außer Zellulose, Glukose als günstige C-Quelle; schnelles und sehr intensives Einsetzen der Zersetzung.

Wichtig ist, daß in der ersten Reihe überhaupt eine Zersetzung eintritt. Die Frage ist, woher bezieht in dieser rein anorganischen Nährlösung der Symbiont die Energiequelle? Aus der Tatsache, daß in der Nährlösung 15 die Zersetzung später eintritt, können wir schließen, daß erst Stoffe gebildet werden müssen, die in den beiden anderen Nährlösungen schon vorhanden sind, nämlich die C-Quellen.

Durch die Enzymstudien von Pringsheim (26 a) u. a. wissen wir, daß die Zelluloselösung in zwei Phasen vor sich geht. Zunächst wird die Zellulose durch hydrolytische Fermente über Cellobiose bis zur Glukose gespalten. Die Glukose wird dann durch Gärungsfermente bis zur Kohlensäure abgebaut. Durch geeignete Antiseptika bzw. durch Aufbewahren bei 67° oder Zimmertemperatur gelang es, die Gärungsfermente auszuschalten, so daß der Abbau nur bis zur Cellobiose bzw. Glukose ging. In eigenen Versuchen konnte ich durch Jodoformzusatz ebenfalls die Gärungsfermente zum Stillstand bringen und reduzierende Zucker nachweisen. Pringsheim arbeitete mit Mischkulturen, es werden daher bei ihm ähnliche Symbioseverhältnisse vorgelegen haben, wie bei meinen Versuchen. Nun geben Clausen und Cowles und Rettger übereinstimmend an, daß ihre Formen (Stecknadelformen, die den Organismen Omelianskis entsprechen sollen) Glukose nicht angreifen können. Es schien also so, als ob die Zersetzung durch die Stecknadelform nur bis zur Glukose geht, und der restliche Abbau durch die Symbionten erfolgt. Der Zellulosezersetzer stellte dann dem Symbionten ein Kohlehydrat zur Verfügung in Form der aus Zellulose gebildeten Glukose, während der Symbiont dem Zellulosezersetzer dafür einen anderen Stoff darreichte.

Ganz so einfach dürften die Symbioseverhältnisse allerdings nicht liegen. Die Hydrolyse der Zellulose zur Glukose ist ein Vorgang, bei dem keine wesentlichen Energien frei werden. Man fragt sich, woher bezieht der Zellulosezersetzer seine Energie? Man kann kaum annehmen, daß die Stoffe, die der Symbiont dem Zellulosezersetzer zur Verfügung stellt, als Energiequelle dienen können.

Cowles und Rettger gelang es, eine symbiontenfreie Zersetzung durch diese Stecknadelform zu erzielen. Hierbei blieb die Zersetzung nicht bei der Bildung von Glukose stehen, sondern ging weiter unter Bildung von Wasserstoff, Kohlensäure und organischen Säuren. Wie läßt es sich erklären, daß Cowles und Rettger auf der einen Seite beobachteten, daß der Zellulosezersetzer Glukose nicht anzugreifen vermag, auf der anderen Seite beim symbiontenfreien Zelluloseabbau die intermediär gebildete

Glukose glatt bis zu Kohlensäure, Wasserstoff und organischen Säuren abgebaut wird? Es läßt sich durchaus denken, daß die intermediär gebildete, wahrscheinlich nicht stabilisierte Form der Glukose für die Zellulosezersetzer angreifbar ist, während die stabilisierte Form, die Cowles und Rettger in der Zuckerreihe anwendeten, nicht angegriffen wird. Mindestens ebenso wahrscheinlich ist aber, daß die zur Zuckerreihe sowohl von Clausen wie von Cowles und Rettger verwendete Nährlösung (Hefewasser bzw. Fleischwasser + K_2HPO_4) für den Glukoseabbau nicht vollwertig war, daß vielleicht irgendwelche Kationen (Mg?) fehlten. Denn in den eigenen Untersuchungen mit der Stecknadelform wurde Glukose gut angegriffen (Nährlösung 30 + Glukose). Wir können daher annehmen, daß der Zellulosezersetzer am völligen Abbau der Zellulose beteiligt ist, daß er Glukose abbauen kann, sei es in stabilisierter oder in nichtstabilisierter Form. Hierbei wird wahrscheinlich nicht die gesamte Glukose selbst verbraucht, sondern ein Teil davon dem Symbionten zur Verfügung gestellt. Es sei hier an die entsprechenden Verhältnisse beim Amyloverfahren erinnert, wo Amylomyces auch nicht die gesamte gespaltene Stärke selbst verbraucht; hier wird sogar ein sehr großer Teil des gebildeten Zuckers von der Hefe weiterverarbeitet.

Es ist sicher, daß zur ersten Entwicklung des Symbiosesystems gewisse C-Mengen vorhanden sein müssen. Diese Mengen können so geringfügig sein, daß sie durch die üblichen Nachweismethoden gar nicht erfaßt werden können. Gewöhnlich wird durch reichliches Impfmaterial bereits ein in Entwicklung stehendes Symbiosesystem in die Nährlösung gebracht. — (Omelianski schreibt auch, daß nur bei reichlicher Einsaat die Zersetzung erfolgt.) Beim oben beschriebenen Symbioseversuch (Tab. 7, 8) war die Impfmenge im Vergleich zu den Versuchen im kleinen Einmachglas (S. 24) sehr gering. Die Beimpfung erfolgte in der oben beschriebenen Weise (S. 19). Es wird jetzt klar, daß in der Reihe mit der Nährlösung 15 (Tab. 7 und 8) die Zellulosezersetzung so lückenhaft eintritt. Ein Glukosemengenversuch zeigte, daß die beste Zersetzung bei einem Zusatz von 0,1 bis 0,01% Glukose erfolgte.

Es bleibt noch die andere Seite der Symbiose zu klären, nämlich die Bedeutung des Symbionten. Im Symbioseversuch sehen wir, daß eine große Anzahl sehr verschiedenartiger Organismen zur Symbiose befähigt ist; diese lassen sich ohne weiteres noch nicht auf einen gemeinsamen Nenner bringen. Wir können aber daraus schließen, daß der zur Verfügung gestellte Stoff allgemeiner Natur sein muß. Ich habe diese Frage schon an anderer Stelle angeschnitten (S. 17). Wahrscheinlich handelt es sich um einen N-Körper. Cowles und Rettger haben bei ihrer Stecknadelform den Symbionten durch Rindfleischwasser ersetzen können. Das gleiche gelang mir bei der Plectridienform, merkwürdigerweise jedoch nicht bei der Stecknadelform. Auf Grund der Ergebnisse aus dem Mengenversuch mit der Plectridienform vermutete ich, daß das Fehlschlagen der Versuche darauf zurückzuführen sei, daß die Konzentration der verwendeten Nährlösung zu hoch sei. Das war in der Tat der Fall, wie ein Mengenversuch zeigte. In späteren Versuchen verwendete ich mit gleich gutem Erfolg zur symbiontenfreien Zersetzung die übliche Grundlösung mit einem Zusatz von nur 0,1% Pepton und 0,1% Liebigs Fleischextrakt (Nährlösung 30). Da wir also die Symbionten durch Zusätze von Pepton und Fleischextrakt ersetzen können, liegt es nahe, anzunehmen, daß ihre Stoffwechselprodukte eiweißartiger

Natur sind. Daß eiweißartige Produkte von Bakterien ausgeschieden werden, ist mehrfach beobachtet worden. So konnte Müller (22) bei seinen Untersuchungen mit Pansenbakterien, die auf Amid-haltigen Nährböden gezüchtet wurden, hochmolekulare N-Verbindungen nachweisen, die eine gewisse Ähnlichkeit mit Pepton und Reineiweiß hatten, und Sjollema und van der Zande (33) beobachteten eine Tyrosin- und Tryptophansynthese aus eiweißfreier Nährlösung durch Pansenbakterien. Auch Simola (32) berichtet von der Bildung stickstoffhaltiger Schleimsubstanzen durch seine aeroben Zellulosezersetzer.

Völlig ersetzt werden kann die Symbiose durch die Eiweißzugabe jedoch nicht, denn in Symbiose mit Bact. coli geht die Zersetzung stets viel weiter. Das liegt jedenfalls daran, daß der Symbiont dem Zellulosezersetzer fortlaufend die N-Körper darbietet, während bei der symbiontenfreien Zersetzung die N-Körper nur einmal gereicht werden und bald erschöpft sind. Eine größere Eiweißmenge darf von vornherein nicht gegeben werden, da dann die Zersetzung überhaupt nicht eintritt, sei es, daß die größere Eiweißmenge wachstumshemmend wirkt, sei es, daß sie von den Zellulosezersetzern als C-Quelle der Zellulose vorgezogen wird, und als Folge davon das Zellulosezersetzungsvermögen überhaupt verloren geht, wie wir es bei den Agarkulturen gesehen haben. Es ist aber auch möglich, daß die Nährlösung noch nicht vollwertig genug ist, daß noch irgendwelche Stoffe fehlen, die eine bessere Zersetzung gewährleisten würden. Auf alle Fälle ist die Symbiose mit Bact. coli den natürlichen Verhältnissen am weitgehendsten angepaßt.

Schließlich sei erwähnt, daß die Bedeutung der Symbionten auch noch in der Schaffung anaerober Verhältnisse gesucht werden kann. Wie der Symbioseversuch zeigt, trat in den meisten Fällen auch aerob eine Zersetzung ein. In einem späteren Vergleichsversuch zwischen symbiontenfreier und symbiontischer Zersetzung tritt das noch klarer hervor. Während in Symbiose mit Bact. coli selbst in solchen Röhrchen eine Zersetzung eintrat, die vorher zur Anreicherung von Sauerstoff kräftig geschüttelt wurden, erfolgte sie in der symbiontenfreien Reihe nur unter anaeroben Bedingungen.

2. Die symbiontenfreie Zersetzung.

Ich erwähnte bereits im vorigen Abschnitt, daß die symbiontenfreie Zersetzung nicht so intensiv vor sich geht wie die in Symbiose mit Bact. coli. Man erkennt das schon rein äußerlich am Verlauf der Zersetzung. Das Filtrierpapier wird zunächst wie bei der Zersetzung mit Symbionten unter Gasbildung zerklüftet und unter Umständen durch die Gasblasen an die Oberfläche gehoben. Die Zersetzung tritt meist normal ein nach 10—14 Tagen (in Symbiose mit Bact. coli manchmal schon nach 8 Tagen) und hört nach weiteren 10—20 Tagen auf. Das Papier liegt dann, in die einzelnen Fasern zerfallen, am Boden des Röhrchens, ist aber nicht vollkommen zersetzt; das Bild ist etwa das gleiche wie bei der Zersetzung durch die Plectridienform. Die Zersetzung in Symbiose mit Bact. coli geht weiter, aus den einzelnen Fasern wird eine formlose Masse. (Auffallend ist die Bildung einer mehr oder minder starken Haut aus Kalziumkarbonat an der Oberfläche der Flüssigkeit.)

Dem makroskopischen Bilde entspricht das mikroskopische. Die Korrosion ist deutlich, geht bei symbiontenfreier Zersetzung aber ebenfalls nur

bis zu dem Stadium, das für die Plectridienform charakteristisch ist (Abb. 8), auf den Fasern liegen nur wenige Organismen. Das Bild der Zersetzung in Symbiose mit Bact. coli nähert sich dagegen mehr dem der Zersetzung mit Rohkulturen (Abb. 6). Die Fasern sind dicht bedeckt mit den rundsporigen Stecknadelformen und den Kurzstäbchen von Bact. coli. Die Veränderungen von Salat- und Pappelblättern waren bei Zersetzung mit und ohne Symbionten die gleichen wie bei der oben beschriebenen Zersetzung durch die Plectridienform.

Auf Grund der Verhältnisse bei der Zersetzung mit Symbionten kam ich zu dem Schluß, daß der Zellulosezersetzer nicht die Gesamtmenge der intermediär gebildeten Zucker selbst verbraucht, sondern den restlichen Teil dem Symbionten zur Verfügung stellt. Danach mußte bei symbiontenfreier Zersetzung diese restliche Zuckermenge sich nachweisen lassen. Die angestellten Versuche scheinen diese Vermutung zu bestätigen. Der Inhalt verschiedener Röhrchen aus symbiontenfreier Zersetzung wurde abfiltriert, das Eiweiß mit Fehling I und Natronlauge ausgefällt und abfiltriert und die klare Lösung der Fehlingschen Probe unterworfen, die deutlich positiv ausfiel. Zur Darstellung der Osazone wurde die Lösung anderer Kulturen eingedampft. Hierbei war ein Honiggeruch wahrnehmbar. Nach dem Kochen mit Phenylhydrazinchlorhydrat und Natriumazetat fielen in der Kälte nadelartige gelbe Kristalle aus. Ein Teil hiervon löste sich in heißem Wasser, der Rest nur in 50% Alkohol. Zu einer Identifizierung der Körper reichten die so gewonnenen Mengen nicht aus.

Es ist möglich, daß hier wie bei der reinen chemischen Hydrolyse der Zellulose und den entsprechenden Enzymversuchen mit Mischkulturen unter Zusatz von antiseptischen Mitteln (Pringsheim 26 a), Cellobiose und Glukose gebildet wurden. In gleicher Weise konnten Tetrault (36) und Peterson und Mitarbeiter (26) direkt ohne Zusatz von antiseptischen Mitteln in ihren Kulturen Glukose nachweisen, und Scott und Mitarbeiter (30) zeigten, daß Glukose nur in „purified cultures", also in ziemlich reinen Kulturen, gebildet wird, aber nicht in Rohkulturen (crude culture) und Anreicherungskulturen (enrichment culture).

Während bei der Plectridienform nur ganz selten eine Gasbildung beobachtet wurde, ist die Zersetzung durch die anaerobe Stecknadelform stets von der Bildung größerer Gasmengen begleitet. Die Gase wurden mit einer ähnlichen Apparatur aufgefangen, wie sie von Werner (38) beschrieben wird, und nach der Methode von Pauschard (25) bestimmt[1]). Die für die Kohlensäure gefundenen Werte geben natürlich nicht die tatsächlich gebildeten Mengen an, da eine bestimmte Menge von der Nährlösung gelöst und damit zurückgehalten wird. Da ohne Kreide die Zersetzung entweder überhaupt nicht erfolgt, oder sehr bald still steht, mußte der Nährlösung Kreide zugesetzt werden. Bei der Zersetzung entstehen aber Säuren, die aus der Kreide Kohlensäure freimachen; daher läßt sich die absolute Menge der Kohlensäure, die beim Zelluloseabbau gebildet wird, nur sehr schwer ermitteln. Die Gasanalysen haben daher nur qualitativen Wert. Außer Kohlensäure wurde Wasserstoff festgestellt, der wahrscheinlich 50% der Gesamtgasmenge ausmacht. In 3 von 9 Gasanalysen (mit und ohne Symbionten) wurden Methan nachgewiesen, aber in Mengen (0,6—0,8%), die

[1]) Herrn Dr. Bärenfänger und Herrn Dr. Pauschard vom Städt. Laboratorium in Kiel möchte ich auch an dieser Stelle aufrichtig danken für die freundliche Unterstützung bei der Ausführung der Gasanalysen.

nahezu in die Fehlergrenzen fallen. Wie bei Clausen und Cowles und Rettger haben wir also wahrscheinlich eine reine Wasserstoffgärung vor uns.

Der Nachweis der Fettsäuren erfolgte nach der Methode von van Dyer (7). Eine Untersuchung auf Milchsäure wurde noch nicht angestellt. Ihre Bildung ist durchaus möglich, besonders bei Verwendung von Bact. coli, aber auch bei symbiontenfreier Zersetzung, da der normale Abbau der Glukose auch zur Milchsäure führen kann. Aus der symbiontenfreien Zersetzung wie aus der in Symbiose mit Bact. coli oder aerogenes, wurde neben höheren nicht bestimmbaren Säuren Essig- und Ameisensäure gebildet, in Symbiose mit B. saccharobutyricus außerdem auch Buttersäure.

Mit der Feststellung, daß die Symbiose mit einem Buttersäurebildner im Zelluloseabbau Buttersäure liefert, war die eingangs aufgestellte Behauptung bestätigt, daß die Endprodukte der Zellulosezersetzung abhängig sind von der jeweiligen Begleitflora. Die Bildung von Methan, die von Omelianski als eine besondere Art der Zellulosezersetzung angesehen wird, wird daher wahrscheinlich auf einen methanbildenden Symbionten zurückzuführen sein; vielleicht wird das Methan aber auch erst sekundär gebildet aus den Abbauprodukten der Zellulosezersetzung (Metabiose). Nach den Untersuchungen von Söhngen (35) ist das durchaus möglich. Er stellte fest, daß Ameisen- und Essigsäure sowie alle Fettsäuren mit gerader Anzahl von C-Atomen zur Methanbildung verwertbar sind. Außerdem konnten seine Organismen freien Wasserstoff als Energiequelle zur Reduktion von Kohlensäure zu Methan gebrauchen. Nach den eigenen Untersuchungen sind gerade Kohlensäure, Wasserstoff, Essig- und Ameisensäure die Endprodukte der symbiontenfreien Zersetzung. Weitere Angaben über die Methanbildung aus Buttersäure finden sich bei Bredemann (4). In gleicher Weise läßt sich die Bildung von Schwefelwasserstoff erklären. Sie tritt ständig in den Anreicherungskulturen auf, aber nie mehr in Reinkulturen. Rubentschik (27, 28) konnte zeigen, daß auch hier Butter- und Essigsäure als Endprodukte der Zellulosezersetzung als C bzw. Energiequelle für den sulfatreduzierenden Organismus dienen konnte.

3. Die Verwertung von Amiden und ähnlichen N-Verbindungen.

Wie verschiedene Fütterungsversuche ergeben haben (vgl. Mangold 21), werden Amide und ebenso Ammoniumsalze organischer Säuren nur vom Wiederkäuer ausgenutzt. Zuntz (39) hat zwar die eiweißsparende Wirkung der Amide auf eine Ablenkung der Bakterien vom Futtereiweiß zurückgeführt. Dann müßte aber die gleiche Ablenkung auch bei Tieren ohne Pansenverdauung ebensogut stattfinden können. Wir können u. a. aus dieser Tatsache schließen, daß vom Wiederkäuer die Ausnutzung dieser Substanzen nicht direkt erfolgen kann, sondern nur auf dem Umwege über die Bakterien (und zwar wahrscheinlich durch Verdauung der Bakterien). Mit anderen Worten, diese Substanzen würden ohne Bakterien ungenutzt den Organismus wieder verlassen. Die Verwendung von Asparagin zur Züchtung von Zellulosezersetzern legte den Gedanken nahe, daß auch die Zelluloseverdauung irgendwie mit der Amidausnutzung verknüpft sei, daß die Amide vielleicht als N-Quelle hierbei verwertet würden und so dem Wiederkäuer zugute kämen.

In eigenen Versuchen hatte ich feststellen können, daß in der Nährlösung für Zellulosezersetzer das Asparagin durch Glukose ersetzt werden kann, es schien also so, als ob Asparagin auch als C-Quelle dienen konnte. Um diese Fragen beantworten zu können, mußte ich von möglichst einfach zusammengesetzten Nährlösungen ausgehen. Die Grundnährlösung enthielt: 0,1% K_2HPO_4, 0,2% Ammoniumsulfat, 0,2% Magnesiumsulfat, 0,1% Natriumchlorid und Spuren Eisenchlorid. Die Amide wurden in einer Menge von 0,2% hinzugegeben.

Der Versuch zeigte zunächst, daß eine symbiontenfreie Zersetzung nirgends eintrat. D. h. der Zellulosezersetzer vermag weder Ammoniumsulfat noch Ammoniumazetat noch eines der dargebotenen Amide als N-Quelle auszunutzen. Damit haben aber die Amide ihre Bedeutung für die Zellulosezersetzung noch nicht verloren, denn der Symbiont vermag vielleicht aus einigen von ihnen Stoffe zu bilden, die dem eigentlichen Zellulosezersetzer als N-Quelle dienen.

Tab. 9. Amidversuch.

		Stecknadelform 1			Stecknadelform 2		Plectridienform	
		allein	+ Bact. coli	+ Bac. putrific.	allein	+ Bact. coli	allein	+ Bact. coli
Grundlösung	+ Ammonsulfat	—	—	—	—	—	—	+
	+ Ammonazetat	—	—	—	—	+	—	+
	+ Harnstoff	—	+	+	—	+	—	+
	+ Asparagin	—	—	—	—	+	—	+
	+ Betain	—	—	—	—	—	—	—
	+ Alanin	—	—	—	—	+	—	+
	+ Leuzin	—	—	—	—	+	—	+
	+ Glykokoll	—	—	—	—	—	—	—
Grundlösung + Glukose	+ Ammonsulfat	—	—	+	—	+	—	+
	+ Ammonazetat	—	+	+	—	+	—	—
	+ Harnstoff	—	+	—	—	+	—	+
	+ Asparagin	—	+	+	—	+	—	—
	+ Betain	—	+	+	—	—	—	—
	+ Alanin	—	—	—	—	—	—	+
	+ Leuzin	—	+	—	—	+	—	+
	+ Glykokoll	—	—	—	—	—	—	—
Grundlösung + Ammonsulfat	+ Ammonazetat	—	—	—	—	—	—	—
	+ Harnstoff	—	—	—	—	—	—	—
	+ Asparagin	—	—	—	—	+	—	?
	+ Betain	—	—	—	—	—	—	+
	+ Alanin	—	—	—	—	+	—	—
	+ Leuzin	—	—	+	—	+	—	+
	+ Glykokoll	—	—	—	—	—	—	+

In der ersten Reihe (Tab. 9)[1]) wurde außer den zu untersuchenden Stoffen keine N- oder C-Quelle geboten, die dem Symbionten hätte zur

[1]) Zu den Versuchen mit der Stecknadelform 1 wurde ein Colistamm verwendet, der längere Zeit auf Agar fortgezüchtet und daher wohl etwas geschwächt war. Wahrscheinlich ist es hierauf zurückzuführen, daß nicht überall dort eine Zersetzung eintrat, wo es nach den Ergebnissen der anderen Reihe (Stecknadelform 2 und frischer Colistamm) hätte erwartet werden können.

ersten Entwicklung dienen können. Wenn also in einigen Fällen bei Gegenwart von Symbionten eine Zersetzung der Zellulose eintrat, so konnte hier der Symbiont die organischen N-Verbindungen sowohl als C- wie als N-Quelle ausnutzen. Es waren Ammonazetat, Harnstoff, Asparagin, Alanin und Leuzin. (Weshalb bei der Plectridienform auch bei Zusatz von Ammonsulfat, das naturgemäß nur N-Quelle sein kann, eine Zersetzung eintreten konnte, wurde bereits an anderer Stelle [S. 17] besprochen.)

In einer zweiten Reihe wurde der Grundlösung außerdem Glukose zugesetzt, da aus den Fütterungsversuchen bekannt ist, daß die eiweißsparende Wirkung der Amide nur dann erzielt wird, wenn ein geeignetes Kohlehydrat gereicht wird. Tatsächlich trat bei dieser Reihe außer bei den oben erwähnten Verbindungen auch bei Ammonsulfat und Betain eine Zersetzung ein, letzteres kann also nur als N-Quelle dienen. Bei Gegenwart von Glykokoll erfolgt keine Zersetzung (vgl. unten).

Interessant ist nun, daß in einer dritten Reihe, wo zur Grundlösung Ammonsulfat an Stelle von Glukose gegeben wurde, wo also die untersuchten Substanzen als C-Quelle dienen sollten, nur bei Asparagin, Alanin und Leuzin eine Zersetzung erfolgte. Nach den Ergebnissen der ersten Reihe hätte man doch erwarten können, daß hier Harnstoff und Ammonazetat ebenfalls als C-Quelle dienen würden. Wahrscheinlich werden sie nur dann als C-Quelle fungieren, wenn sie gleichzeitig auch als N-Quelle dienen.

Wenn wir das positive Ergebnis beim Glykokoll in der dritten Reihe mit der Plectridienform nicht in der oben beschriebenen Weise deuten, könnte man annehmen, daß Glykokoll nur als C-Quelle dienen kann, um so mehr, als nach den Fütterungsversuchen von Ungerer (37) Glykokoll einen deutlichen positiven Einfluß auf den Fettgehalt der Milch ausübt, während Milchmenge und Milchtrockensubstanz abnehmen.

D. Zusammenfassung und Schluß.

1. Zur Isolierung von anaeroben sporenbildenden Zellulosezersetzern ist es empfehlenswert, solche Kulturen als Ausgangsmaterial zu verwenden, die möglichst wenig aerobe Sporenbildner und viel hitzeempfindliche Begleitorganismen enthalten, die man durch 10 Min. langes Erhitzen auf 80° also ausschalten kann.

2. Auf anaerob bebrüteten Platten (vor allem mit Bouillon-Asparagin-Agar nach Clausen) wurde Koloniewachstum von „Stecknadelformen“ (Langstäbchen mit endständiger runder Spore, die den Organismen von Omelianski entsprechen) erhalten. Diese Formen zersetzten aber keine Zellulose, wahrscheinlich weil sie durch die Agarpassage ihr Zersetzungsvermögen verloren hatten. Es gelang auch nicht, durch Zugabe verschiedener Symbionten, Nährlösungen und „natürlicher“ Zellulosen eine Zellulosezersetzung zu erreichen.

3. Daher wurde zur Reinzüchtung noch zersetzungsfähiger Stämme auf das Ausschneideverfahren von Werner zurückgegriffen. Die Entfernung eines aeroben Sporenbildners machte große Schwierigkeiten, sie gelang schließlich durch Kombinierung von Ausschneideverfahren und Verdünnungsmethode. Auf diese Weise wurde ein anaerober Zellulosezersetzer (Stecknadelform) isoliert.

4. Dieser Organismus zersetzt Zellulose in eiweißfreier Nährlösung nur in Symbiose mit anderen Organismen, am besten mit Bact. coli. Durch Zusatz von Fleischextrakt und Pepton in ganz bestimmter geringer Kon-

zentration gelingt es, eine Zersetzung auch ohne Symbionten zu erhalten. An Abbauprodukten wurden bei symbiontenfreier Zersetzung nachgewiesen: Ameisen-, Essig- und Kohlensäure sowie Wasserstoff.

5. Betreffs der Symbiosewirkung im Reagenzglas ist folgende Hypothese aufgestellt: Vom Zellulosezersetzer wird aus Zellulose Cellobiose bzw. Glukose gebildet, diese aber nur zum Teil weiter abgebaut zu Wasserstoff, Kohlensäure, Ameisensäure und Essigsäure. Ein anderer Teil steht dem Symbionten zur Verfügung, der die Glukose je nach seinen Eigenschaften zu verschiedenen Endprodukten abbauen kann. Als „Gegenleistung" scheidet der Symbiont höhere N-Verbindungen aus, die er aus Amiden und einfacheren N-Quellen synthetisiert hat.

6. Außer der Stecknadelform wurde eine aerob wachsende Plectridienform durch Koloniewachstum isoliert, die Zellulose ebenfalls angreifen kann, wenn sie dazu auch sehr lange Zeit braucht. Wahrscheinlich gehört dieser Organismus in die B. macerans-Gruppe. Er zeigt im wesentlichen dieselben Eigenschaften wie die Stecknadelform und ist in eiweißfreier Nährlösung auch an Symbionten gebunden.

Es ist natürlich nicht möglich, auf Grund der Beobachtungen an zwei Arten von Zellulosezersetzern im Reagenzglas, von denen der eine auch noch eine extrem lange Zersetzungszeit hat, ein abschließendes Urteil abzugeben über die Vorgänge, die sich beim Zelluloseabbau im Darm der Pflanzenfresser abspielen. Wir haben an anderer Stelle schon gesehen, daß für den Zelluloseabbau wesentlich mehr Organismen in Frage kommen. Wir dürfen auch nicht vergessen, daß die Ergebnisse aus Reagenzglasversuchen nicht ohne weiteres auf die natürlichen Verhältnisse im Verdauungstraktus zu übertragen sind. Immerhin scheinen gewisse Übereinstimmungen zwischen den Analysen der im Darm auftretenden Produkte und den Ergebnissen zu bestehen, die ich an der Stecknadelform erzielte. Diese Ergebnisse scheinen auch für eine größere Anzahl von Organismen Gültigkeit zu haben, denn die Notwendigkeit der Symbiose wurde nicht nur bei morphologisch ähnlichen Organismen (verschiedene Stecknadelformen durch Clausen und Cowles und Rettger, Thermophile durch Snieszko), sondern auch bei anderen Formen (Plectridienform und Stecknadelform mit ovaler Spore) beobachtet. Im Verdauungstraktus werden die Zellulosezersetzer schwerlich auf die Unterstützung von Symbionten angewiesen sein, da hier stets das nötige Eiweiß vorhanden sein wird.

Nehmen wir unter diesen Voraussetzungen an, daß der Abbau der Zellulose durch die anderen noch nicht näher bekannten Organismen nicht wesentlich anders verläuft, so können wir uns folgende Vorstellung von der Zellulosezersetzung im Verdauungstraktus machen: Die Zellulose wird zunächst durch die eigentlichen Zellulosezersetzer in Cellobiose bzw. Glukose gespalten; diese intermediär gebildeten Zucker werden zum Teil durch die Zellulosezersetzer, zum Teil durch die übrigen Organismen zu Ameisen- und Essigsäure (evtl. auch Milchsäure) sowie zu Wasserstoff und Kohlensäure abgebaut. Buttersäure wird von den Zellulosezersetzern nicht gebildet, wohl aber durch die Begleitflora. Andere Organismen werden die Säuren und den Wasserstoff wieder als C- bzw. Energiequelle bei der Bildung von Methan verwerten.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Henneberg, sage ich für die Überlassung des Themas und für seine gütige Beratung bei der Ausführung der Arbeit meinen verbindlichsten Dank.

Verzeichnis der Nährlösungen.

Zellulose-Leber-Bouillon siehe Clausen (5)
Bouillon-Asparagin-Agar siehe Clausen (5)
Nährlösung 4. siehe Clausen (5)
Nährlösung 7. siehe Clausen (5)
Nährlösung B. siehe Bokor (3)

Nährlösung 12. 1000 Fleischwasser
5 Asparagin
10 Pepton
5 Kochsalz

Nährlösung 13. 1000 Aqua dest.
1 K_2HPO_4
2 $MgSO_4$
1 NaCl
2 $(NH_4)_2SO_4$
3 Asparagin
Spuren $FeSO_4$

Besonders geeignet für Zersetzungen in Symbiose mit Bact. coli. An Stelle von Asparagin kann auch Glukose (0,1%, vgl. Nährlösung 15 D) verwendet werden.

Nährlösung 14. 1000 Rindfleischwasser
5 Pepton
1 K_2HPO_4

(Cowles u. Rettger.) Besonders geeignet für symbiontenfreie Zersetzung durch die Plectridienform, für Zersetzungen mit der Stecknadelform nicht geeignet.

Nährlösung 15. N-L 13 ohne Asparagin
Nährlösung 15 D. N-L 15 + 1 Glukose
Nährlösung 16. N-L 13 ohne Ammoniumsulfat

Nährlösung 17. 1000 Aqua dest.
3 Harnstoff
2 $MgSO_4$
1 K_2HPO_4
1 NaCl
Spuren $FeSO_4$

Nährlösung 18. N-L 17 + 2 $(NH_4)_2SO_4$

Nährlösung 19. 1000 Aqua dest.
2 KNO_3
2 $MgSO_4$
1 K_2HPO_4
1 NaCl
Spuren $FeSO_4$

Nährlösung 20. N-L 19 + 3 Asparagin
Nährlösung 21. N-L 19 + 3 Harnstoff

Nährlösung 22. 1000 Leitungswasser
5 Liebigs Fleischextrakt
5 NaCl
10 Pepton

Nährlösung 23. N-L 22 ohne Pepton
Nährlösung 24. N-L 22 ohne Liebigs Fleischextrakt

Nährlösung 25. 1000 Leitungswasser
5 Liebigs Fleischextrakt
3 KNO_3

Nährlösung 26. 1000 Leitungswasser
5 Liebigs Fleischextrakt
10 Pepton
1 K_2HPO_4

Nährlösung 27. Siehe Löhnis und Lochhead (20).
Nährlösung 28. Siehe Fred und Waksman (8).
Nährlösung 29. Siehe Sarles, Fred und Peterson (29)

Nährlösung 30. 1000 Aqua dest.
1 K_2HPO_4
1 NaCl
2 $MgSO_4$
2 $(NH_4)_2SO_4$
1 Pepton
1 Liebigs Fleischextrakt

Für symbiontenfreie Zersetzungen mit der Stecknadelform.

Soweit nicht anders angegeben ist, wurde den Nahrlösungen Kreide zugesetzt. Als Zellulose wurden Filtrierpapierstreifen verwendet.

Literaturverzeichnis.

1. Baker, Frank, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 452. — 2. Ders., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 17. — 3. Bokor, Rudolf, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 1. — 4. Bredemann, G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 86. 1932. S. 352. — 5. Clausen, Paul, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 20. — 6. Cowles, Th. B., und Rettger, L. F., Journ. of Bact. Vol. 21. 1931. p. 107. — 7. van Dyer, Journ. of biolog. chemistry. Vol. 28. p. 445. — 8. Fred and Waksmann, Laboratory Manual of General Microbiology. 1928. — 9. Gescher, Norbert von, Faserforschung. Bd. 2. 1922. S. 28. — 10. Haberlandt, G., Beiträge z. allgem. Bot. Bd. 1. 1918. Heft 4. — 11. Ders., Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch. Bd. 45. 1915. S. 253. — 12. Henneberg, W., Berl. klin. Wochenschr. Bd. 29. 1919. S. 693. — 13. Ders., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 55. 1922. S. 242. — 14. Ders., Handb. d. Gärungsbakteriol. 2. Aufl. Berlin 1926. — 15. Henneberg, W., und Stohmann, F., Ztschr. f. Biol. Bd. 21. 1885. S. 613. — 16. Iterson jr., C. van, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. 1904. S. 689. — 17. Kellermann, K. F., und McBeth, J. G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. S. 485. — 18. Kellner, O., Die Ernährung der landwirtschaftlichen Nutztiere. 8. Aufl. Berlin 1924. — 19. Khouvine, Y., Ann. de l'Institut Pasteur. T. 37. 1924. p. 711. — 20. Löhnis, F., und Lochhead, G., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 37. 1913. S. 490. — 21. Mangold, E., Handb. d. Ernährung und des Stoffwechsels d. landw. Nutztiere. Bd. II. 1929. — 22. Müller, M., Pflügers Archiv. Bd. 112. 1906. S. 245. — 23. Omelianski, W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 8. 1902. S. 225, 257, 289, 321, 353, 385. — 24. Nach Oppenheimer, C., Chemische Grundlagen der Lebensvorgänge. Leipzig 1933. — 25. Pauschardt, Das Gas- und Wasserfach. Heft 26. 1913. S. 613. — 26. Peterson, W. H., Scott, S. W., und Thompson, W. S., Biochem. Ztschr. Bd. 219. 1930. S. 1. — 26a) Pringsheim, Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 78. 1912. S. 288. — 27. Rubentschik, L., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 73. 1928. S. 483. — 28. Ders., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 182. — 29. Sarles, Fred und Peterson, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 85. 1932. S. 401. — 30. Scott, Fred and Peterson, Ind. Eng. Chem. Vol. 22. 1930. p. 731. — 31. Simola, Ann. Acad. Scient. Fennicae. Serie A. T. 34. No. 1. Helsinki 1931. — 32. Ders., Ann. Acad. Scient. Fennicae. Serie A. T. 34. No. 6. Helsinki 1931. — 33. Sjollema, B., und van der Zande, Proc. Koninkl. Akad. Wetensch. Amsterdam. Bd. 25. 1922. S. 482; zitiert nach: Schieblich in Mangold (21). — 34. Snieszko, St., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 403. — 35. Söhngen, N. L., Rev. Bac. chim. Pays-Bas. Vol. 29. 1910. p. 238; ref. im Chem. Zentralbl. II. 1910. S. 980. — 36. Tetrault, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 81. 1930. S. 28. — 37. Ungerer, E., Biochem. Ztschr. Bd. 147. 1924. S. 275. — 38. Werner, E., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 67. 1926. S. 297. — 39. Zuntz, N., Pflügers Archiv. Bd. 49. 1891. S. 477.

Nachdruck verboten.

Die biologische Bearbeitung der Pflanzenreste.

III. Die Vermehrung des Azotobacters und die Anhäufung von Stickstoff bei der Zersetzung von Pflanzenresten.

[Aus dem Mikrobiologischen Laboratorium des Leningrader Instituts der Bastpflanzen.]

Von I. A. Makrinow.

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Möglichkeit der Vermehrung des Azotobacters (im folgenden durch Az. bezeichnet) und die Anhäufung von Stickstoff im Torfe, hatte den Wunsch zur Folge, dieselbe Erscheinung auch bei unveränderten Pflanzenteilen, z. B. bei verschiedenen Sorten von Stroh zu erzielen. Zu den Versuchen wurde Haferstroh verwendet, weil letzteres im Vergleich z. B. zu Roggenstroh infolge von Armut an Stickstoff und löslichen Kohlenhydraten einer biologischen Einwirkung sehr zugänglich ist. Die Haferstrohhalme wurden in kleine Teile zerschnitten, nicht sterilisiert, sondern nur mit heißem Wasser

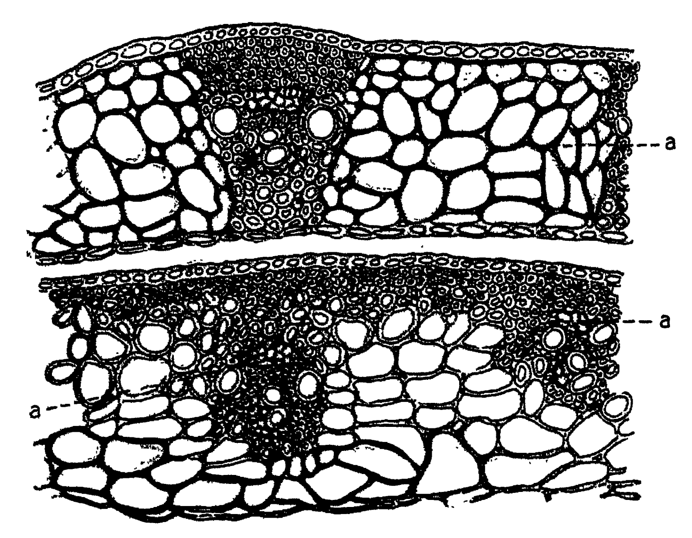


Abb. 1. Querschnitt des Haferstrohs vor der Bearbeitung: oben der Blattscheide, unten des Stengels. (Bearbeitet mit Chlor-Zink-Jod; a = blaugefärbtes Gewebe-Zellulose.)

(70—75° C) gewaschen und lose in Gefäße eingelegt, welche mit Wasser unter Zugabe folgender Salze: $K_2HPO_4 = 0{,}1\%$, $MgSO_4 = 0{,}05\%$, $CaCO_3 = 0{,}3\%$ aufgefüllt und sodann mit einem Gemisch aus Zellulose- und stickstoffixierenden Bakterien infiziert wurden. In den Kontrollgefäßen wurden die Strohhalme genau ebenso bearbeitet und bekamen dasselbe Quantum eines sterilisierten Gemisches von Zellulosebakterien und Az. Der Prozeß verlief bei genügendem Luftzutritt im Zimmer bei 18—20° C. Am Anfang des Versuches wurde eine zahlenmäßige Bestimmung von Az. vorgenommen: sie betrug ungefähr einige zehn Zellen auf je 1 g Stroh. Nach Verlauf von

8 Tagen wuchs die Zahl der Az.-Zellen bemerkbar und betrug einige Hunderttausend auf 1 g trockenen Strohes, wobei die Aussaat auf Mannit- oder Dextrin-Agar ein intensives Wachstum und einen höchst aktiven Zustand des Az. ergab.

Nach Verlauf von 3 Wochen wurde eine eingehende anatomische und mikrochemische Prüfung der Haferstengel vorgenommen, um zu erforschen, welche Veränderungen im Bau und in der chemischen Zusammensetzung der Strohhalme vor sich gegangen waren; ferner wurden die Halmstücke auch mikroskopisch untersucht, um die Anhäufungen der Az.-Zellen und der Zellulosebakterien festzustellen.

Alle diese Ergebnisse, welche im weiteren eingehend angeführt sind, zeigen zweifellos, daß hier ein tiefgreifender Prozeß der Zersetzung der Ge-

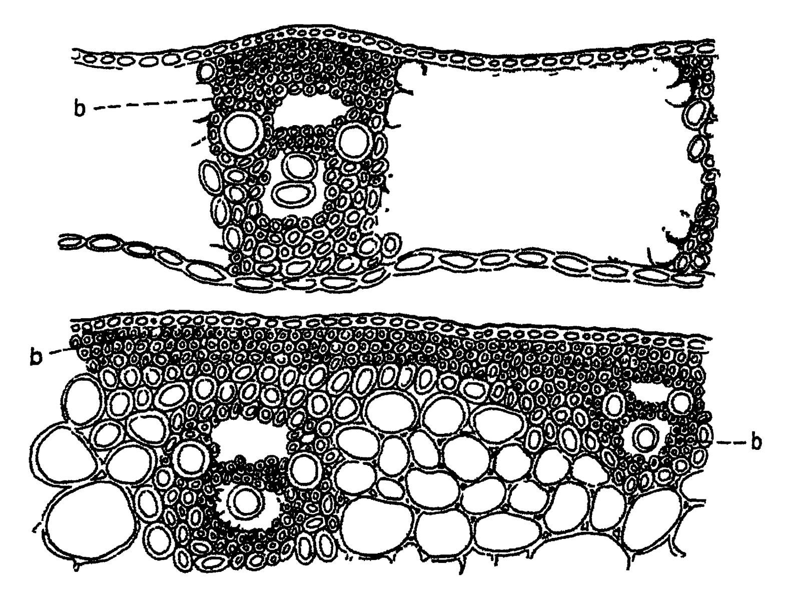


Abb. 2. Querschnitt des bearbeiteten Haferstrohs: oben die Blattscheide, unten der Stengel. (Bearbeitet mit Chlor-Zink-Jod; b = gelb gefärbt, verholzte Zellen.)

webe, eine starke Vermehrung des Az. und der Zellulosebakterien vor sich geht; so haben die anatomischen und mikrochemischen Untersuchungen ein fast vollkommenes Verschwinden der Zellulose, welche sich durch Chlor-Zink-Jod blau-violett färbt, ergeben. Zerstört sind das Parenchym der Blattscheide, der Bastfaserteil der Gefäßbündel und ein Teil des Parenchyms des Stengels, mit einem Worte: alles, was aus reiner Zellulose bestand und durch Cl-Zn-J blau-violett gefärbt wurde (in Abb. 1a alle Zellen mit dunkler Membran). Alle verholzten Teile (Abb. 2b) färbten sich durch Cl-Zn-J gelb und veränderten sich nach Abschluß dieser Phase des Prozesses nicht. Somit war das Parenchymgewebe der Blattscheide sowohl wie des Stengels vollkommen zerstört, in demselben war auch das reine Lignin der Gefäßbündel zersetzt, während alle anderen Gewebe, welche sich durch Cl-Zn-J strohgelb färben, d. h. aus Lignin bestehen, unverändert und von den Mikroben nicht angegriffen wurden.

Diese Beobachtung zeigte, daß auch im Haferstroh die Tätigkeit der Zellulosebakterien und des Az. sich auf Kosten der Zersetzung der Zellulose verwirklicht, wie z. B. auf künstlichem Mineralnährboden mit schwedischem Filterpapier in den Versuchen von Pringsheim und Koch. Während dieser Phase des Prozesses betrug die Zahl der Az.-Zellen Hunderte von Millionen je Gramm Stengelsubstanz. Die Az.-Zellen waren in allen Geweben des Stengels reichlich verstreut: auf der Oberfläche der Blattscheide, auf der Innenseite, auf der Oberfläche des Stengels selbst und besonders im zersetzten Gewebe des Stengels (s. Abb. 5). Die Vermehrung der Zellulosebakterien, welche hauptsächlich den Gattungen Cytophaga und Vibrio angehörten, war vielleicht noch intensiver als die Vermehrung des Az.

Diese Feststellungen brachten mich auf den Gedanken, den Versuch noch weiter zu fuhren, um zu beobachten, ob auch das Lignin von den Bakterien angegriffen werden würde; zu diesem Zwecke wurde der Versuch mit einem Teil der Stengel noch einen Monat lang fortgefuhrt, ergab aber negative Resultate. Daraus ist zu schließen, daß bei der vorliegenden Kombination von nur Zellulosebakterien und Az. ausschließlich die reine Zellulose zerstört wird. Diese reine Zellulose der Getreidestengel unterscheidet sich jedoch stark z. B. von der Zellulose der Leinbastfasern: die erstere wird, wie unsere Versuche zeigten, durch die Mikroben der Pektingärung zersetzt; die zweite wird von letzteren nicht angegriffen. Es hat also den Anschein, daß die Zellulose des Parenchymgewebes der Roggen- und Haferstengel sich ihrer Natur nach von der typischen Zellulose des schwedischen Filtrierpapiers oder der Leinfaser unterscheidet. Daraus erklärt sich die Tatsache der üppigen Vermehrung der Cytophaga- und der Zellulose-Vibrioarten, welche auf reine Zellulose (Bastfasern, schwedisches Filterpapier) in besonderer Weise wirken, indem kolloidale Körper gebildet werden, aber nicht imstande sind, sie gänzlich zu zerstören.

Nach Verlauf von 3 Wochen wurde die Zunahme des Gesamtstickstoffes durch chemische Analyse festgestellt (s. Tab. 1).

Tab. 1. Der Gesamtstickstoffgehalt in den infizierten und Kontrollstengeln.

Material	Die absolut trockene Probe in g	Die Menge des n/10 H_2SO_4 in ccm	Die Menge des n/10 NaOH in ccm	Differenz in ccm	Gesamtstickstoffgehalt in g	Stickstoff in %	Bereicherung an Stickstoff in %
Kontrollstengel . .	1,5234	51,22	47,42	3,80	0,005320	0,350	0,44
Bearbeitete Stengel	1,1931	51,22	44,46	6,76	0,009464	0,790	
Kontrollstengel . .	1,6321	51,23	47,42	3,81	0,005334	0,326	
	1,9783	51,23	46,78	4,45	0,006230	0,314	0,51
Bearbeitete Stengel	1,6551	50,30	40,38	9,90	0,013860	0,830	

Der Faktor von n/10 H_2SO_4 = 1,0245; von n/10 NaOH = 1,0221.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die Bereicherung an Stickstoff in den zwei Bestimmungen 0,47% oder 4,75 mg auf 1 g Trockensubstanz des Stengels betrug; solch eine Bereicherung ist als genügend hoch anzusehen. W. L. Omeljansky erzielte in seinen zahlreichen und höchst genauen Versuchen gewöhnlich bei Anwendung von Mannit und Dextrin durch-

schnittlich einen Stickstoffzuwuchs von 2,1—3,6 mg auf 1 g der zersetzten Substanz. Die mikrobiologischen Untersuchungen ergaben eine Vermehrung des Az. auf den Hauptstengeln. Es wurde eine Zahlung des Az. nach der Methode von Winogradsky vorgenommen. Diese Untersuchungen zeigten, daß die Az.-Zellen größtenteils auf der Außen- und Innenseite der Blattscheide verstreut waren (Abb. 3). In vielen Fällen wurden in den Fetzen des zersetzten Gewebes enorme Anhäufungen von Az.-Zellen beobachtet. Man sah hier das gewöhnliche Bild einer Mischung von Az. und Zellulosebakterien: die letzteren waren viel zahlreicher und wiederum hauptsächlich durch zwei Gattungen, Cytophaga und Vibrio, vertreten.

Die Mikroflora der Begleitbakterien ist gewohnlich sehr karg, sowohl nach ihrer Quantität als auch nach der Zahl der Arten; sie ist nur durch einige Pilzarten vertreten. Die Sporen dieser Pilze färben sich rotlich-braun, lassen sich leicht von den Az.-Zellen unterscheiden und werden im Laufe des ganzen Prozesses beobachtet. Während dieser Phase des Prozesses wurde eine Entwicklung der Pilze nicht beobachtet — wahrscheinlich infolge von allzu starker Befeuchtung.



Abb. 3. Anhaufungen von Az-Zellen.

Aus zerkleinerten, bearbeiteten Haferstengeln sind Präparate nach Winogradsky angelegt worden: die Az.-Zellen wurden in verschiedenen, nicht weniger als in 25, Gesichtsfeldern je Präparat gezählt, dann die Durchschnittswerte genommen und diese auf je 1 g lufttrockenen Stengels für jedes Präparat getrennt berechnet.

Anzahl der Az.-Zellen in 1 g trockener Haferhalme:

1. Praparat	924 446 153
2. Praparat	672 875 390
3. Praparat	569 653 846
4. Praparat	656 407 602
Durchschnittlich	693 330 770

Aus den angeführten Zahlen ist ersichtlich. daß auf je 1 g Trockengewicht 693 330 770 Az.-Zellen kommen. Diese Zahl erklärt den beträchtlichen Zuwuchs an Gesamtstickstoff in 12—14 Tagen nach Beginn des Versuches; nach dieser Zeit war sämtliche reine Zellulose zerstört: das Lignin blieb jedoch unberührt — das ist die erste Phase des Prozesses. Dann mußte die Tätigkeit der Pilze einsetzen, um auch das Lignin zu zerstören.

Sporen verschiedener Pilze sind von uns zwischen Az.-Zellen auch im Laufe der ersten Phase des Prozesses beobachtet worden: während dieser Periode konnten sich die Pilze infolge von zu großer Feuchtigkeit nicht entwickeln und ihre Tätigkeit entfalten. Nachdem ein Stillstand in der Vermehrung des Az. und des Stickstoffes festgestellt worden war, wurden die Hauptstengel bei sehr schwacher Befeuchtung, freiem Luftzutritt und einer

Temperatur von 20—22° C gehalten. Von diesem Moment an keimten die Sporen, die sich bis dahin im Ruhezustande auf den Stengeln befunden hatten, rasch aus und entwickelten ein üppiges Myzel, welches das Gewebe der Stengel bald nach verschiedenen Richtungen hin ausfüllte. Nach einiger Zeit — etwa 8—10 Tagen — konnte man selbst bei leichtem Zerreiben einen völligen Zerfall der Haferstengel beobachten. Die Stengel wurden bräunlich.

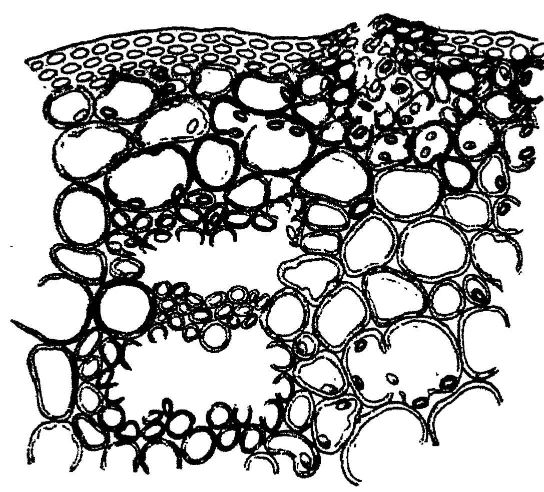


Abb. 4. Deformiertes Gewebe am Ende des Prozesses (Reaktion von Moyle).

Die mikroskopische Untersuchung der Gewebe am Ende der zweiten Phase zeigte das Vorhandensein von Pilzmyzel, einer Anzahl Pilzsporen und dazwischen Az.-Zellen von geringer Größe. Die anatomische und mikrochemische wie auch die chemische und mikrobiologische Untersuchung der Stengel ergab folgende Resultate: dem anatomischen Bau nach war das Gewebe der Stengel stark deformiert; an vielen Stellen war es vollständig vernichtet; an anderen — halbzerstört; dabei ergab eine mikrochemische Analyse tiefgreifende Veränderungen in der chemischen Zusammensetzung der Gewebe; so zeigte die Moyle-Reaktion an vielen Stellen eine braune Färbung des Lignins statt der normalen — gelben (Abb. 4). Eine Zählung der Az.-Zellen ergab folgende Resultate:



Abb. 5. Anhäufungen von Az.-Zellen im zersetzten Gewebe am Ende des Prozesses.

Zahl der Az.-Zellen in 1 g Trockengewicht während der zweiten Phase des Prozesses:

1. Präparat	864 956 432
2. Präparat	1 174 894 354
3. Präparat	789 867 946
4. Präparat	973 843 785
Durchschnittlich	950 890 623

Diese Zahlen beweisen, daß während der Pilzphase des Prozesses eine weitere Vermehrung des Az. vor sich geht; die Zahl derselben vergrößert sich ungefähr 1,5 mal. Die bakteriologische Untersuchung der Stengel zeigte in den Geweben desselben ein üppiges Wachstum der Az.-Zellen, welche in höchst aktivem Zustande waren (Abb. 5); die Zellulosebakterien waren gleichfalls aktiv. Bei der Untersuchung der Pilze wurden fünf Pilzarten,

welche sich im Inneren des Stengels entwickelt hatten, in Reinkulturen isoliert. Bei der chemischen Analyse wurde der Gehalt an Stickstoff und Zellulose im Vergleich zu der Kontrolle festgestellt. Die Resultate sind in Tabelle 2 wiedergegeben. Nach der zweiten Phase des Prozesses ist demnach der Stickstoffgehalt im Vergleich zum anfänglichen um mehr als das Dreifache gestiegen, d. h. auf 0,892%. In diesem Zustande enthalten die Haferstengel 7,75% Eiweißstoffe, also ungefähr so viel, wie z. B. Kleeheu. Weiter wurde eine Untersuchung der infizierten und der Kontrollstengel auf den Gehalt an organischen Verbindungen vorgenommen. Diese Untersuchungen zeigten, daß eine Verminderung an organischen Substanzen auf 100% stattgefunden hat. Augenscheinlich vollzog sich diese Verminderung an organischen Stoffen im Anschluß an den Zerfall der Gewebe infolge von spezifischer Einwirkung der Pilze auf dieselben, was aus Abbildung 5 ersichtlich ist.

Tab. 2. Gehalt an Gesamtstickstoff (in %) in dem bearbeiteten und nicht-bearbeiteten Haferstroh (Durchschnittswerte zweier Bestimmungen).

Material	Hygroskopische Feuchtigkeit	Absolut trockene Probe in g	Zahl d. ccm n/10 H_2SO_4	Zahl d. ccm n/10 NaOH	Differenz in ccm	Gehalt an Stickstoff in der Probe in mg	Gehalt an Stickstoff im Haferstroh in %
Unbearbeit. Haferstroh	10,01	1,809	39,64	34,77	4,87	68,18	0,37
Bearbeitetes Haferstroh	9,46	1,459	39,64	26,66	12,98	181,72	1,24

Aus der Abbildung 4 ist ersichtlich, daß ein Teil des übriggebliebenen Gewebes seine Zusammensetzung verändert hat, da es keine typische (Moyle) Reaktion auf Lignin aufweist.

Tab. 3. Gehalt (in %) an „nicht reiner" Zellulose im Haferstroh (nach Henneberg und Stomann).

Material	Absolut trockene Probe in g	Gehalt an Zellulose in der absolut trockenen Probe in g	Gehalt an Zellulose in %
Unbearbeitetes Haferstroh .	2,260	1,2465	55,18
Bearbeitetes Haferstroh .	2,239	0,6137	27,41

Schlußfolgerungen.

1. Bei der Infizierung der Haferstrohhalme mit einem Gemisch aus Az.-Zellen und Zellulosebakterien findet eine üppige Vermehrung dieser beiden Mikrobengruppen bei vollkommener Zerstörung der reinen Zellulose statt.

2. Das Vorhandensein von reiner Zellulose, der Zerfall und die völlige Vernichtung derselben ist leicht durch Untersuchungen des anatomischen Baues und mittels mikrochemischer Reaktionen zu beweisen.

3. Im Zusammenhang mit der starken Vermehrung des Az. ergibt die chemische Analyse eine beträchtliche Zunahme an Gesamtstickstoff, hauptsächlich Eiweißverbindungen.

4. Die chemische Untersuchung der infizierten Halme zeigt eine beständige Abnahme an Rohzellulose im Vergleich zum Gehalt derselben in den Kontrollhalmen.

5. Die zweite Phase des Zerfalls der Haferstrohhalme beginnt mit dem Augenblick der Vermehrung von Pilzen bei geringer Befeuchtung; sie wird durch üppiges Wachstum des Pilzmyzels. weitere Vermehrung des Az., Zerfall der Ligninzellen und teilweise durch Veränderung ihrer chemischen Zusammensetzung charakterisiert.

Nachdruck verboten.

Genetical Studies of Bacteria.

I. The Problem of the Bacterial Nucleus.

[From the Department of Bacteriology, College of Letters, Arts, and Sciences, University of Southern California, Los Angeles.]

By **Carl C. Lindegren.**

With 2 figures in the text.

In discussing the problem of the bacterial nucleus different writers have considered such varied possibilities as no nucleus, all nucleus, diffuse nucleus, etc. Before discussion is attempted, it is well to characterize or define nucleus and cytoplasm. Modern genetics has made it possible to formulate these definitions according to the functions of the components of protoplasm rather than on purely morphological grounds.

1. The gene is the fundamental particulate living unit and without it life is impossible.

2. Life of order of complexity higher than the gene is based on aggregation and mutational differentiation of genes. A linear aggregate of genes is the "chromosome" and an aggregation of chromosomes is the "nucleus" which governs cellular and metabiontic life.

3. The genes characterizing a given higher organism form a definite complement or set which must be present in its entirety to insure normal development of the organism. The organization into a nucleus is the means for maintaining the genes in a definite full number and insuring their descent intact to daughter cells. Most of the genes of this basic haploid set are qualitatively different. Each genic complex is made up of genes which balance and counterbalance the effects of each other. No one gene is either "good" or "bad" by itself, but it is the balanced complex, acting as a whole, which produces the normal organism. Therefore, the total complex of genes can be doubled, tripled. or quadrupled without marked effects to the organism. Most higher plants and animals are diplonts, with two sets of genes. Fungi and bacteria are haplonts with a single set. Removing a small percentage of the total complex causes a deleterious mutation for each gene cooperates with all the others to produce the final normal development. This is Bridges' (1925) law of genic balance.

4. The genes are arranged in the gene-strings in a certain definite order. Disturbing this order may also cause mutational effects. This is Sturtevants' (1925, 1928) law of position effect. Assuming the genes in a string to be linearly arranged as follows:

a b c d e f g

it should make no difference from the standpoint of obtaining an equal distribution to each daughter nucleus if the string should break and reunite to form a string as follows:

a b c g f e d.

But it does sometimes make a difference, that is. produce a variation, to make such rearrangements. This has been interpreted as meaning that genes c and d each produce different substances which react to produce a third substance and this third substance cooperates with the combined products of all the other genes to produce the normal individual. When c is separated from d and placed next to g, the normal local concentrations are disturbed and a variation occurs.

5. It is not the chromatin which is the essential hereditary material. The chromatin like most other protoplasmic constituents is merely produced by the action of the genes. The genes which are imbedded in the chromatin are the essential hereditary materials (Alexander and Bridges 1928). In the so-called resting stage (actually the phase of greatest metabolic activity) of the nuclei of higher forms, chromatin is nearly completely absent from the nucleus. Inert chromosomes and inert regions of chromosomes are usually more heavily encrusted with chromatin than active chromosomes or active regions of chromosomes (Bridges 1930). The possibility that inert regions in bacterial chromosomes may be reduced to a minimum may account for the difficulties experienced in staining them.

6. The cytoplasm has been shown to be responsible for some of the somatic characters. The most convincing work on this problem is that of Harder (1927). The chloroplasts are notable as self-perpetuating entities carried by the cytoplasm, but they are considered by many to be symbiotic organisms (Minchin 1916). Many geneticists hold the view that the effect of cytoplasm (exclusive of the chloroplasts) in producing a somatic character, is due to a negative rather than a positive action. That is, the cytoplasm delays the action of the genes, or starts a developmental sequence in a certain direction before the genes begin to exert their effect as in the case of coiling of the snail, Limnaea (Sturtevant 1923). The opinion held by many is that any cytoplasmic effect will eventually disappear if the action of the genic complex exerting an opposite effect is allowed a sufficiently long time to act. von Wettstein (1930) and Michaelis (1933) have described some notable exceptions to this rule. They hold the view that the cytoplasm carries self-perpetuating entities similar to genes. However, all workers do not agree that the existence of these hypothetical plasmatic units has been proved. In any case, so many more characters result from genic than from cytoplasmic effect that it is more probable that a given character results from the action of a gene than from the action of a cytoplasmic entity.

A nucleus is, therefore, defined as consisting of one or more strings of genes maintained in a definite linear order and always present under nor-

mal conditions in multiples of the haploid number. This definition can be formulated entirely on mathematical data obtained from genetical experiments and completely independently of any morphological demonstration of a nuclear body in the cell. The happy circumstance that in higher forms an apparatus can be demonstrated which corresponds morphologically to the formal concept resulting from genetical experiments identifies this body as the one which carries the genes (Bridges 1916). In the absence of such a morphologically demonstrable body in higher forms, a not at all unlikely possibility, it would have appeared an entirely safe generalization to apply the formal concept of a nucleus to bacteria. Historically, however, the morphological nucleus was first shown to be an important cell inclusion and the formal genetical concept of a nucleus came later. Workers conversant only with the logic demonstrating that the morphological nucleus is an essential cell inclusion refused to admit the existence of a nucleus in bacteria in the absence of morphological evidence. But they feel quite safe in assuming that all the cells of higher forms carry nuclei. The geneticist familiar with the formal concept of the gene feels equally safe in assuming that such a structure is an universal characteristic of life whether or not it is morphologically demonstrable.

If bacterial nuclei were of the simplest possible type, namely, a single gene, there will be no problem of position effect nor of linear order and the gene will always be present in the haploid number. Each gene will naturally constitute a single nucleus and there can be no diffuse nucleus for a single gene cannot exist in a diffuse state. Unless the gene can be postulated as existing in the naked state, a very difficult concept, it will always be surrounded by cytoplasm and exert its influence on the environment through the medium of the cytoplasm. Between the cytoplasm and the gene there may be an intermediate substance, but in case there is none, there will surely be an interfacial tension, a nuclear membrane. In the case of a single nucleus containing a single gene there will be no upset in genic balance by changes in the rates of division of different genes. But if there are two genes in the complex, it becomes necessary to invoke some mechanism to connect the two genes together in order to insure that two are always passed into each daughter nucleus and to insure that they divide synchronously. The failure of any one gene to divide during division of the other would upset genic balance. If there are three genes in the complex, an additional mechanism to insure that the proper linear order is maintained must be invoked. In case the gene string is long and coiled through the cytoplasm, it must still be considered a nucleus because it will at least be separated from the cytoplasm by an interfacial tension. This tension will naturally tend to collect the gene string in the form of a small granule.

Bacteriologists who are willing to accept as a fact the existence of nuclei in fungi, often do not realize the difficulty, almost the impossibility, of demonstrating that the vegetative nuclei of an Ascomycete, such as Neurospora, are true nuclei. The vegetative nuclei of many fungi are demonstrable merely as small densely staining particles. Mitoses of these nuclei have only been observed rarely and then only as elongations of the nuclei. In a very few cases spindle fibers and chromosomes have been distinguished. However, before or at the time of sexual fusion the nuclei enlarge enormously and at these times it becomes evident that the tiny densely staining granules in the vegetative hyphae must have been true nuclei because they

produce structures in the sexual phase that are easily recognized as identical with the nuclei of higher forms. Genetical study has corroborated this conclusion and has shown that the chromosomes in the fungi carry genes which are linked and cross over exactly like those in higher organisms (Lindegren 1933). This corresponds with the findings of Belar (1928) who showed that all the previously reported so-called primitive protozoal nuclei which he and other competent workers had reinvestigated with modern fixing and staining techniques showed true spindles and chromosomes. He drew the conclusion that all healthy nuclei divide only by a true mitotic mechanism and that amitosis with one exception is a pathological condition. In other words, there are no primitive nuclei.

Pietschmann and Rippel (1932) have stated that transverse fission of the bacteria excludes the possibility that the genes in bacteria are arranged in a linear order. They hold the view that if a cell is 0.30 microns in diameter transverse fission would not permit genes as large as 0.07 microns (the maximum size estimated by Morgan 1922) to maintain a linear arrangement. Figure 1 is a series of hypothetical stages in the division of a bacterium drawn to scale. A single gene string (each gene .07 μ

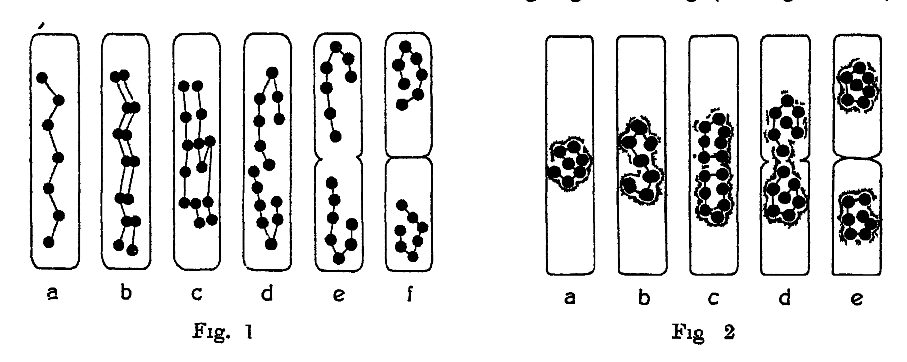


Fig. 1 Fig 2

in diameter) is shown distributed throughout the bacterial cell (.3 μ in diameter) in figure 1a. Figure 1b shows the gene string splitting into two exactly equal halves. Figure 1c shows the split halves being pulled apart by the separation of two particular loci (the spindle-fiber attachments). It is evident that the diameter of the cell does not have to accomodate more than three genes (chromomeres) at any one time. After the pulling action has separated the two gene strings into the opposite halves of the cells (fig. 1 e) the transverse fission divides the cell (fig. 1 f) without disturbing the linear arrangement.

In a preliminary paper, Lindegren and Mellon (1932) have described a diplococcus which has about seven chromomeres in a single haploid chromosome. Belling (1931) considered each chromomere to represent the locus of a single gene. In the giant forms described by Lindegren and Mellon, each gene (to take Belling's view) has collected a sufficient amount of chromatin to make a visible particle (chromomere). This interpretation may also be applied to the Pettenkoferien of Kuhn (1930) and the Reizformen of Pietschmann and Rippel (1932) and Stapp and Zycha (1931). Even if these bodies are true involution forms, i. e., non-viable, this interpretation still holds; for the structures which they contain must have arisen from some preexisting invisible struc-

tures in the vegetative cell. But this does not mean that each gene has increased in size. Merely that it is at the center of the chromomere. It seems probable that in the vegetative cells, the interfacial tensions would operate to collect the gene strings into a small granule. It is possible that somatic division of such a genic complex could apparently be by strangulation, as in the cases described by the Hollandes (1931), but nevertheless result in exactly half of the genes passing into each daughter nucleus. This is shown in figure 2. These diagrams are also hypothetical and not based on observations. In figure 2 a is shown a string of genes collected into what may or may not be a visible particle. Figure 2 b shows a longitudinal split in this gene string. If one chromomere directs the passage of the two halves toward a centrosome, the nucleus will be stretched out at either end and pinched in the middle (fig. 2 c and 2 d) (much as small chromosomes are stretched out and pinched in in the middle at early anaphase). As the two daughter strings are pulled farther apart, the constriction will become narrower until interfacial tension will separate the two genic complexes into two discrete granules (fig. 2 e). In a large multinucleate bacterium several such divisions could take place in a single cell. If each gene is 0.07 microns in diameter, the diameter of a nucleus containing seven genes will be about 0.20 microns. The purpose of these figures is merely to refute the argument that transverse fission of bacteria precludes the possibility of the longitudinal division of a gene string. In the longitudinally splitting chromosomes described by Badian (1933) in B. subtilis, there would be sufficient room for a coiled gene string such as is customarily found in higher forms. This would mean that the number of genes which could be accomodated would be greater than the quotient obtained by dividing the cell diameter by the size of the gene.

It is often implied that if nuclei are present in bacteria, one should be able to demonstrate them cytologically in any bacterial cell. This point of view is an exact parallel to the early objections to the theory that the chromosomes maintain their individuality in the resting nuclei of higher plants and animals when they are not demonstrable cytologically. The chromosome (gene string) is now known to remain intact throughout the life of the organism whether or not it is encrusted with the inert chromatin and thus capable of being made visible. A nucleus is not a chemical compound or identifiable by a specific staining reaction, but is a functional structure and is distinguishable by its structural peculiarities, although the chemical affinities of some of its structures at times assist in demonstrating these structures by staining. The obvious objection to the view that the bacterial nucleus exists in a diffuse state is that a nucleus is a structure whose principal function is to maintain intact the total complement of genes in a definite linear order and any diffusion of such a structure renders it incapable of performing this special function. If each gene were free in the cytoplasm and separated from its neighbor, it would be impossible to transmit the genetical characters from one bacterial cell to another with any considerable degree of constancy. Recently Guillermond (1932) has discovered primitive (?) nuclei in the Rhodothiobacteria and has confirmed the findings of the Hollandes with respect to nuclear structures in B. anthracis and B. typhosus which divide apparently by strangulation. Guillermond considers these structures to be true nuclei of a primitive type. It is purely a question of definition whether or not a nuc-

leus can be considered primitive merely because it divides by strangulation. Genetical theory postulates that in the division of each nuclear body (with the exception of amitoses) the genes must be partitioned equally to each daughter nucleus. If there is any connotation of random distribution of hereditary materials in the word "primitive" as used by Guillermond, it is not a permissable descriptive term.

In the bacteria as in the fungi there may be two distinctly different kinds of cell division. In one, nuclear and cell divisions are synchronized producing uninucleate cells. Such cells have been described by the Hollandes. In the other, the nuclei divide more rapidly than the cells thus producing multinucleate cells. The granular tubercle bacilli may belong to this category. These granules stain well with selective nuclear stains, especially aceto-carmine. The large cells described by Schaudinn (1902) may also be of this type. In each cell of B. butschlii he found a large number of tiny chromatin granules. It is possible that each granule is a true nucleus. When spores were produced a large number of granules passed into each spore. If each granule is a true nucleus, it is possible that each spore contains a large number of nuclei, each nucleus maintaining its own individuality.

Dufrénoy (1931) made observations on Bacterium tabacum similar to those of Stoughton (1930) on Bacterium malvacearum. He concludes that in neither case are the dividing bodies nuclei but that they are vacuoles which divide at each cell division. His conclusion is based on the existence of similar vacuoles in yeasts and the view that it "seems established" that nuclei cannot be vitally stained and the certainty that this cannot be accomplished with neutral red. Further investigation of both these cases with a greater variety of fixing agents and nuclear stains is desirable. Even such a study may not yield conclusive results because of the low specificity of nuclear stains. The cytologist relies more on the structures which he observes than on the specificity of stains in distinguishing the different protoplasmic inclusions. When the nuclei are so small that structure is indistinguishable, it is difficult to draw any conclusions. The following very confusing case in which a highly specific nuclear stain was used is an interesting example. Pietschmann and Rippel (1932) confirmed the original findings of Kirchenstein (1922 cited from P. and R.) who showed that in the formation of spores of Bacillus mycoides the "nucleal positive" substance (by Feulgen's reaction) does not pass into the spore. If genes are present, which is our fundamental assumption, they must pass into the spore. In this case, either the genes do not carry the chromatin, or the chromatin cannot be stained inside the spore, or there are two nuclei one of which is stainable by Feulgen and remains outside the spore while the second which is not stainable by Feulgen passes into the spore. Kirchenstein favors the last view.

Numerous workers have indicated that the chromatin in many bacteria is present in a diffuse state. This has lead to the common view that the nuclear apparatus of a bacterium or its equivalent exists in a diffuse state. The fundamental assumption is obviously that chromatin is an essential nuclear constituent. If this assumption is false, it follows that the conclusion that the nucleus is present in a diffuse state is also false. Many cytologists favor the view that chromatin is not the essential nuclear substance

but an accidental accumulation in the more or less inert regions (Enderlein 1925). In this connection. Alexander and Bridges (1928) say: "That chromatin, particularly basic chromatin, is the substance of greatest importance in the nucleus and is the material concerned with heredity, is a view that is wide spread in the literature of heredity and of biological chemistry. This view seems to us entirely incorrect." It seems logical, therefore, to assume that gene strings rather than chromatin are the essential nuclear constituents and are present in all living forms. The conclusion from such an assumption is that gene strings are present in bacteria since they are living forms.

Summary.

Referring again to the various kinds of protoplasmic structures suggested as possible for bacteria. it is not possible to have a bacterial cell without a nucleus because that would mean that there were no genes. Life without genes is impossible. A diffuse nucleus is also impossible. The problem of the protoplasmic structure of bacteria therefore resolves itself into whether bacterial protoplasm is something totally different from that present in any other kind of living form at present known or whether it is possible to demonstrate the presence of nuclear structure within it either by cytological or by genetical technique.

The writer is grateful to Dr. Calvin B. Bridges for his helpful criticism of the manuscript.

Bibliography.

Alexander, J., and Bridges, C. B., Some Physico-chemical Aspects of life, mutation and evolution. (Science. Vol. 120. 1928. p. 508—510.) — Badian, J., Eine cytologische Untersuchung über das Chromatin und den Entwicklungszyklus der Bakterien. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 4. 1933. S. 409—418.) — Belling, Jr., The ultimate chromomeres of Lilium and Aloe with regard to the numbers of genes. (Univ. of Calif. Publ. in Bot. Vol. 14. 1928. p. 307—318.) — Belar, K., Die cytologischen Grundlagen der Vererbung. (Handb. d. Vererbungswissenschaft. Gebr. Borntraeger, Berlin.) — Bridges, C. B., Non-disjunction as proof of the chromosome theory of heredity. (Genetics. Vol. 1. 1916. p. 1—52, 107—163.) — Bridges, C. B., Sex in relation to chromosomes and genes. (Amer. Natur. Vol. 59. 1925. p. 127—137.) — Bridges, C. B., Meiosis in Drosophila melanogaster. A review of the paper by Dr. A. F. Huettner. (The Collecting Net. Vol. 5. 1930. p. 113.) — Dufrénoy, J., Sur le Vacuome des Bactéries. (C. R. Soc. Biol. T. 108. 1931. p. 617—618.) — Enderlein, G., Bakterien-Cyklogenie. Berlin u. Leipzig (Walter de Gruyter & Co.) 1925. 348 S. — Guillermond, M. A., Cytologie Végétale. — Sur la structure des Bactéries. (Compt. Rend. des Sc. Acad. des Sc. T. 194. 1932. p. 2322.) — Harder, R., Zur Frage nach der Rolle von Kern und Protoplasma im Zellgeschehen und bei der Übertragung von Eigenschaften. (Ztschr. f. Bot. Bd. 19. 1927. S. 338—407.) — Hollande, A. Ch., et Hollande, G., Etudes Cytologiques de Quelques Microbes Pathogènes pour l'Homme Bacterium typhi Eberth. (C. R. Soc. Biol. T. 107. 1931. p. 205—207.) — Hollande, A. Ch., et Hollande, G., Cytologie du Bacillus Anthracis. (C. R. Soc. Biol. T. 108. 1931. p. 731—733.) — Hollande, A. Ch., et Favre, G., La Structure Cytologique de Blattabacterium Cuenoti. (C. R. Soc. Biol. T. 107. 1931. p. 752—754.) — Kirchensteins, A., Structure intérieure et Mode de développement des Bactéries. (Latvigas augskoles Rakst. Acta. U. Latvienses. T. 3. 1922. p. 1—90.) — Kuhn, P. L., Weitere Mitteilungen über Bakterien und Pettenkoferien. (Med. Klin. Bd. 20. 1930.) — Lindegren, Carl C., The Genetics of Neurospora. III. Pure bred stocks and crossing over in N. crassa. (Bull. Tor. Bot. Club. Vol. 60. 1933. p. 133—154.) — Lindegren, Carl C., and Mellon, Ralph R., Nuclear Phenomena Suggesting a sexual Mechanism for the Tubercle Bacillus. (Proc. Soc. Exp. Biol. a. Med.

Vol. 30. 1932. p. 110—112.) — Michaelis, P., Entwicklungsgeschichtlich-genetische Untersuchungen an Epilobium. (Ztschr. f. Ind. Abst.- u. Vererb.l. Bd. 55. 1933. S. 1—71 und 353—411.) — Minchin, E. A., The evolution of the cell. (Amer. Natur. Vol. 50. 1916. In three parts.) — Morgan, T. H., On the mechanism of hereditary. Croonian lecture. (Proc. Roy. Soc. B. Vol. 94. 1922. p. 162—197.) — Pietschmann, K., Die Zellkernfrage bei den Bakterien. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 2. 1931. S. 310—332.) — Pietschmann, K., und Rippel, A., Zur Zellkernfrage bei den Bakterien. Untersuchungen mit Hilfe der Feulgenschen Nuclealreaktion. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 3. 1932. S. 422—452.) — Schaudinn, F., Beiträge zur Kenntnis der Bakterien und der Wanderorganismen. I. Bac. Bütschlii. (Arch. Prot. Bd. 1. 1902. S. 306—343.) — Stapp, C. M., und Zycha, H., Morphologische Untersuchungen an Bacillus mycoides; ein Beitrag zur Frage des Pleomorphismus der Bakterien. (Arch. f. Mikrobiologie. Bd. 2. 1931. S. 493—536.) — Stoughton, R. H., The Morphology and Cytology of Bacterium malvacearum E. F. S. (Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Vol. 105. 1931. p. 469—484.) — Sturtevant, A. H., Inheritance of direction of coiling in Limnaea. (Science. Vol. 58. 1923. p. 269—270.) — Sturtevant, A. H., The effect of unequal crossing over at the bar locus in Drosophila. (Genetics. Vol. 10. 1925. p. 117—147.) — Sturtevant, A. H., A further study of the so-called mutations at the Bar locus of Drosophila. (Genetics. Vol. 13. 1928. p. 401—409.) — Wettstein, Fritz von, Über plasmatische Vererbung sowie Plasma- und Genwirkung. II. (Nachr. v. d. Gesellsch. d. Wissensch. zu Gottingen. Bd. 6. 1930. S. 109—118.)

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Biologie und Bekämpfung des Apfelschorfes (Fusicladium dendriticum [Wallr.] Fckl.).

[Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel und Pflanzenschutzgeräte der Biologischen Reichsanstalt, Berlin-Dahlem.]

Von **A. Winkelmann** und **W. Holz.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Obwohl die Bekämpfung des Apfelschorfes durch Spritzung bereits seit mehr als 30 Jahren durchgeführt wird, sind die Erfolge dieser Spritzungen noch sehr wechselnd. Der Grund hierfür liegt u. E. vor allem darin, daß man bei der Bekämpfung die Spritztermine nach der Entwicklung des Baumes festgelegt hat und die Entwicklung des Erregers unberücksichtigt ließ. Auf Grund der Untersuchungen von Aderhold, Wiesmann und einer Reihe von amerikanischen Forschern wissen wir, daß der Erreger in seiner Entwicklung von Witterungsverhältnissen sehr beeinflußt wird und daß es daher durchaus erklärlich ist, daß die Krankheit nicht immer zu derselben Zeit und in demselben Entwicklungsstadium des Baumes auftritt. Durch diesen Umstand wird die Bekämpfung natürlich sehr erschwert und es erscheint unmöglich, allgemein gültige Regeln für die Bekämpfung aufzustellen.

Bei unseren Untersuchungen sollte daher zunächst die Entwicklung des Erregers des Apfelschorfes (Fusicladium dendriticum) unter den hier herrschenden klimatischen Bedingungen beobachtet werden und im Anschluß daran sollte ermittelt werden, wann die Bekämpfung den größten Erfolg hat. Daß solche Untersuchungen äußerst wichtig sind, hat vor kurzem noch Ludwigs betont. Auch Wiesmann hat darauf

hingewiesen, daß diese Fragen in verschiedenen Gegenden unter verschiedenen Bedingungen untersucht werden müßten.

I. Die Entwicklung des Fusicladiums und seine Abhängigkeit von klimatischen Faktoren.

Um einen Anhaltspunkt zu haben, wann der „Sporenflug" einsetzt, wurden entsprechend den Versuchen von Wiesmann Mitte November 1933 Blätter verschiedener Apfelsorten und Herkunfte in Blumentöpfe gepackt und im Garten so aufgestellt, daß sie allen Witterungseinflüssen ausgesetzt waren. Zur Verfugung standen Blätter folgender Apfelsorten: Gravensteiner, Goldparmäne, Herberts Renette, Baumanns Renette, Roter Herbstkalvill und Kassler Renette. Die Blätter stammten mit Ausnahme der Sorte Gravensteiner und einer Sorte Goldparmäne aus dem Versuchsgarten der Biologischen Reichsanstalt. Die Beobachtung der Blätter setzte im Februar 1934 ein. Zu diesem Zweck wurden einige Blätter den Töpfen entnommen, in Kalilauge aufgehellt und bei 103facher Vergrößerung die Größe der Perithezien gemessen. Die Größe der Perithezien bei den verschiedenen Untersuchungsterminen ist aus nachstehender Tabelle zu ersehen.

Tabelle 1.

Sorte	Große der Perithezien in μ				1. Sporenaussaat
	12. 2.	23. 2.	5. 3.	20. 3.	
Gravensteiner	60—100	—105	—120	—190	10. April
Goldparmane I	0— 80	—	—150	—155	14. April
Goldparmane II	30— 60	— 65	— 75	— 85	3. Mai
Herberts Renette	80—100	—150	—150	—150	10. April
Baumanns Renette	30— 60	— 60	— 70	— 70	8. Mai
Roter Herbstkalvill	—	—120	—185	—185	10. April
Kassler Renette	40—110	—125	—125	—140	8. Mai

Es zeigte sich also, daß die Entwicklung bei den einzelnen Sorten und selbst bei den verschiedenen Herkünften einer Sorte nicht gleich schnell ging. Am weitesten waren die Sorten Gravensteiner und Roter Herbstkalvill. Aus den Perithezien dieser Sorten konnten bereits am 20. März schwach gelb gefärbte Askosporen gequetscht werden.

Auf die in den Blumentöpfen befindlichen Blätter wurde ab 23. März weitmaschiger Draht und auf diesen Objektträger gelegt, die auf der den Blättern zugewandten Seite mit Vaseline bestrichen waren, um die etwa ausgeschleuderten Askosporen aufzufangen. Die Sporenfänger wurden durchweg täglich ersetzt und auf ihnen eine Fläche von 24 × 32 mm nach Askosporen abgesucht.

Ebenso wie die Entwicklung der Perithezien bei den verschiedenen Sorten und Herkünften war auch die Askosporenaussaat verschieden und setzte auch nicht zu gleicher Zeit ein (Tab. 1). Während Gravensteiner, Goldparmäne I und Roter Herbstkalvill bereits am 10. bzw. 14. April Askosporen auszuschleudern begannen, wurden bei Goldparmäne II, Baumanns und Kassler Renette die ersten Sporen am 3. bzw. 8. Mai gefunden. Auch der weitere Verlauf und die Intensität der „Sporenaussaaten" waren bei den einzelnen Sorten und Herkünften sehr verschieden.

Tabelle 2.

Sorte: Gravensteiner

Datum	10. 4.	14. 4.	20. 4.	24. 4.	2. 5.	11. 5.	26. 5.	
Anzahl der Askosporen .	2000	5000	3000	1500	500	115	35	

Sorte: Goldparmäne I

Datum	14. 4.	20. 4.	25. 4.	9. 5.	11. 5.	26. 5.	20. 6.	27. 6.
Anzahl der Askosporen .	79	99	2400	1520	1200	520	150	72

Sorte: Herberts Renette

Datum	10. 4.	18. 4.	25. 4.	11. 5.	26. 5.	13. 6.	30. 6.	
Anzahl der Askosporen .	11	280	350	450	490	68	44	

In der Tab. 2 sind nur die stärksten Sporenaussaaten aufgeführt. Die Sporenaussaaten der 4 übrigen untersuchten Sorten waren weniger häufig und außerdem auch verhältnismäßig schwach. Unsere Feststellungen über die Sporenaussaaten der verschiedenen Sorten decken sich mit den Beobachtungen früherer Forscher. So berichten Frey und Keitt, daß die Perithezien in Blättern von Apfelsorten, die früh im Herbst das Laub abwarfen, auch zeitiger im Frühjahr reif sind. Dieselbe Beobachtung machte noch Wiesmann. Er nahm aber außerdem an, daß die verschiedenen Apfelschorfrassen im Blatt verschiedener Entwicklungszeiten bedürfen und daß daraus der verschiedene Beginn der Sporenaussaaten zu erklären ist.

Der Einfluß der Feuchtigkeit auf das Einsetzen der Sporenaussaat wurde zuerst von Aderhold untersucht. Er konnte feststellen, daß die Entleerung der Perithezien in der feuchten Kammer schon innerhalb weniger Tage beendet war, während im Freien durch häufige Trockenperioden dieser Vorgang sich über Monate hin erstreckte. Schneiderhan und Fromme machten die Beobachtung, daß die Anzahl der Sporenaussaaten in feuchten Jahren größer war als in trockenen und daß in feuchten Jahren außerdem schneller die Sporenaussaat beendet war. Frey und Keitt, die den Einfluß der Feuchtigkeit auf die Sporenaussaat im Laboratorium genauer untersuchten, fanden, daß 3—15 Std. nach der Benetzung der Blätter die Sporenaussaat einsetzte. Auch bei den Untersuchungen von Wiesmann begannen die Sporenaussaaten erst dann, wenn die Blätter vollkommen mit Wasser durchtränkt waren. Starker Tau genügte daher nicht, um die Sporenaussaat in Gang zu bringen.

In der Tab. 3 sind die Sporenaussaaten der 3 Apfelsorten, die am stärksten Sporen schleuderten, eingetragen, außerdem die Regenmengen und die Temperaturen während der Beobachtungszeit. Auch aus diesen unseren Feststellungen geht hervor, daß eine Sporenaussaat nur nach einem Regen erfolgt. In einzelnen Fällen, wenn die Niederschlagsmengen sehr hoch waren — in unserem Falle am 11. und 30. 4. — wurden auch noch am 2. Tage Askosporen gefunden. Anderseits war die herrschende Temperatur ohne Einfluß auf die Sporenaussaat.

Zum Fangen der Sporen in der Luft wurden von uns mit Wollfett bestrichene Objektträger, die in Drahtbügeln eingeklemmt waren, die uns von Herrn Dr. Rothe von der Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt in Stade freundlicherweise zur Verfügung gestellt waren, verwendet. Die Drahtbügel ließen sich überall leicht anbringen und die Objektträger konnten leicht ausgewechselt werden. Die Sporenfänger wurden an Apfelbäumen in Höhe der untersten Zweige etwa 1—2 m über dem Erdboden aufgehängt. Die Objektträger wurden zweimal wöchentlich ausgewechselt und ebenfalls eine Fläche von 24 × 32 mm nach Sporen abgesucht. Für die Untersuchungen standen uns 3 Obstgärten zur Verfügung, und zwar der Versuchsgarten der Biologischen Reichsanstalt, der Obstgarten der Wernerschule vom Roten Kreuz in Berlin-Lankwitz und die Obstanlage des Herrn Welter in Zossen.

Tabelle 3.

Zeit	Anzahl der Sporen Graven-steiner	Gold-parmäne I	Herberts Renette	Temperatur Mittel °C	Regenmenge in mm
3. 4.	0	0	0	—	0
3.—10. 4.	0	0	11	9	7,7
10.—11. 4.	2000	0	4	5	9,6
11.—12. 4.	335	0	0	8	0
12.—13. 4.	121	3	0	6,5	1,4
13.—14. 4.	5000	79	0	11	0,1
14.—15. 4.	0	0	0	13,5	0
15.—16. 4.	0	0	0	18	0
16.—17. 4.	0	0	0	20	0
17.—18. 4.	600	71	280	20	5,0
18.—19. 4.	0	0	0	13,5	0
19.—20. 4.	3000	99	92	13	0,8
20.—21. 4.	0	0	0	10	0
21.—23. 4.	0	0	0	12	0
23.—24. 4.	1500	18	0	11	2,3
24.—25. 4.	350	2400	350	11	0,6
25.—27. 4.	0	0	0	12,5	0,3
27.—28. 4.	0	0	0	15	0
28.—30. 4.	480	0	2	17,5	19,8
30. 4.—2. 5.	500	16	14	18	0
2.— 3. 5.	0	0	0	20	0
3.— 4. 5.	140	74	270	23	2,1
4.— 5. 5.	12	0	0	18,5	0
5.— 8. 5.	29	300	190	18,5	1,7
8.— 9. 5.	37	1520	390	13,5	6,1
9.—11. 5.	115	1200	450	16,5	0,2
11.—12. 5.	0	0	0	18	0
12.—15. 5.	0	5	0	13,5	0
15.—19. 5.	0	55	78	12,5	0,4
19.—23. 5.	110	230	185	17	3,5
23.—26. 5.	39	520	490	10,5	0
26.—30. 5.	0	320	120	10	6,5
30. 5.—2. 6.	0	0	0	18,5	0
2.— 6. 6.	0	15	65	14,5	2,0
6.—13. 6.	0	0	68	16,5	5,2
13.—20. 6.	0	120	44	19	2,2
20.—27. 6.	0	72	0	18	4,3
27. 6.—4. 7.	0	0	0	19,5	0,1
4.—11. 7.	0	0	0	19,5	0

In allen 3 Gärten setzte der 1. Sporenflug am 10. 4. ein. Am 13. war er im wesentlichen beendet. Am 16. 4. begann der 2. Flug, dessen Maximum in Zossen zwischen dem 19. und 23. 4., in Dahlem zwischen dem 24. und 27. 4. und in Lankwitz zwischen dem 20. und 24. 4. lag. In Lankwitz stieg der Flug dann noch einmal zwischen dem 27. und 30. 4. an. Der 2. Sporenflug war überall Ende April beendet. In Dahlem und Zossen wurde noch ein 3. Flug beobachtet, der Anfang Mai begann und am 20. 5. abgeschlossen war. Der Höhepunkt lag in Dahlem am 3. 5., in Zossen am 8. 5. In Lankwitz wurde der 3. Flug erst im letzten Drittel des Mai beobachtet. Ende Mai konnte in diesem Jahr der Askosporenflug an allen 3 Versuchsstellen als beendet angesehen werden. Nur ganz vereinzelt wurden in den Monaten Juni und Juli noch Askosporen gefunden. In der Abb. 1 sind diese Flüge nicht mehr berücksichtigt. Aderhold, Keitt und Jones und

Wiesmann geben an, daß diese späten Fluge fur die Infektion nicht mehr von Bedeutung sind.

Aus der Abbildung geht u. a. hervor, daß der Sporenflug in den 3 Obstgärten sehr verschieden war. Die größte Menge wurde jeweils bei dem 2. Sporenflug beobachtet, und zwar wurden auf je 13 Sporenfallen in Zossen 48, in Lankwitz 20 und in Dahlem 16 Askosporen gefunden. Beim 1. und 3. Sporenflug waren die Zahlenverhältnisse etwa die gleichen, die

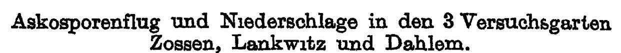

Askosporenflug und Niederschlage in den 3 Versuchsgarten Zossen, Lankwitz und Dahlem.

Abb 1.

Mengen aber wesentlich geringer. Zum Vergleich sollen noch einige Zahlen angefuhrt werden, die von fruheren Forschern beobachtet wurden. So fand Wiesmann auf 6 Sporenfallen, auf denen Flächen von 28 × 47 mm untersucht wurden, bei dem stärksten Flug 20—25 Askosporen. Kent zählte in der Zeit des Hauptfluges der Askosporen (24. 4. bis 5. 5.) auf 1 qcm 5 Askosporen. Viel höhere Zahlen wurden von Frey und Keitt und Keitt und Jones gefunden. Allerdings war ihre Untersuchungsmethode eine ganz andere. Mit Hilfe einer Pumpe saugten sie nämlich 5 Std. lang Gartenluft durch ein Filter. Im Maximum zählten sie auf etwa 28 l der durchgesaugten Luft 71—85 Askosporen.

Bei der Besprechung der Versuche mit überwinterten Blättern war schon darauf hingewiesen worden, daß Sporenaussaaten nur bei oder nach Regen beobachtet wurden. Auch in der Luft wurden Sporen durchweg nur bei oder nach einem Regen gefunden. Diese Feststellungen decken sich ebenfalls mit den Ergebnissen von Frey und Keitt, Keitt und Jones und Wiesmann.

Die Niederschlagshöhe z. Z. des 1. Sporenfluges betrug in Zossen 25 mm, in Lankwitz 15 mm und in Dahlem 17,3 mm. Während des Hauptsporenfluges war sie wesentlich geringer, in Zossen 4 mm, in Lankwitz 5,5 mm, in Dahlem 3,2 mm. Die Zahl der Sporen war also nicht von der Höhe der Niederschläge abhängig.

Die Beobachtung der Sporenaussaat sollte uns zunächst Anhaltspunkte für den Beginn des Sporenfluges geben. Tatsächlich wurden an demselben Tage, an dem das Ausschleudern der Askosporen an den überwinterten Blättern begann, die ersten Sporen in der Luft gefunden. Diese Tatsache ist an sich nicht verwunderlich, da zum mindesten ein Teil der in der Luft vorhandenen Sporen von Blättern stammt, die auf dem Boden liegen. Die weitere Frage war nun, ob die Sporenaussaat auf den überwinterten Blättern parallel mit dem Flug der Sporen in der Luft geht. Es zeigte sich, daß die Zahl der Sporen von überwinterten Blättern und die Zahl der Sporen in der Luft einzelner Tage nicht im gleichen Verhältnis standen.

Falls man über die Verbreitung der Sporen durch Beobachtung von überwinterten Blättern schon ein richtiges Bild bekommt, würde das insofern von Vorteil sein, als die Feststellung der Zahl der Sporen auf den Objektträgern, die auf die Blätter gelegt werden, einfacher ist, als das Absuchen nach vereinzelten Sporen auf den aufgehängten Sporenfängern. Zur Klärung der Frage sind noch weitere Untersuchungen erforderlich. Insbesondere sind eine größere Zahl von Apfelsorten zu untersuchen, da wir ebenfalls beobachten konnten, daß die Sporenaussaat bei den verschiedenen Sorten nicht zu gleicher Zeit einsetzt.

Der 1. Askosporenflug am 10. 4. erfolgte in diesem Jahr zu der Zeit, als sich die Knospen der Apfelbäume soeben öffneten. Der Hauptflug der Askosporen in der Zeit vom 20. bis 30. 4. traf die Bäume kurz vor der Blüte, teilweise noch in der Blüte. Der letzte stärkere Sporenflug fand kurz nach der Blüte statt. Die Sporenflüge trafen also die Bäume vom Aufbruch der Knospen bis kurz nach der Blüte. Während dieser Zeit war also die Möglichkeit der Infektion gegeben. Die ersten Fusicladiumrasen waren auf den Blättern an allen 3 Versuchsstellen zur gleichen Zeit vom 5.—10. 5., also kurz nach der Blüte, zu sehen. Nach den Freilandbeobachtungen von Wallace, Schneiderhan, Frey und Keitt und Keitt und Jones sowie den Ergebnissen bei der künstlichen Infektion von Keitt und Jones ist die Inkubationszeit etwa 14 Tage, nach Angabe von Rudloff 3 Wochen. In unserem Falle müßte demnach die Infektion zwischen dem 20. und 30. 4. stattgefunden haben, also z. Z. des Hauptfluges der Sporen.

Betrachtet man nochmals die Witterungsverhältnisse z. Z. der Sporenflüge, so kann man zunächst feststellen, daß die Niederschlagsmengen z. Z. des 1. Sporenfluges wesentlich höher als z. Z. des 2. Sporenfluges, der in unserem Falle die Infektion verursachte, waren. Anders verhielt es sich jedoch mit den Temperaturen z. Z. der beiden Sporenflüge (Tab. 4).

Tabelle 4.

	Temperatur Min. Max. 1. Sporenflug °C	Temperatur Min. Max. 2. Sporenflug °C
Zossen	0 bis 10,5	3,5 bis 24
Lankwitz	0 „ 6	1 „ 24
Dahlem	2,3 „ 15,6	2,8 „ 21

Über den Einfluß der Temperatur auf die Infektion mit Fusicladium wissen wir bis jetzt verhältnismäßig wenig, da die Erzeugung künstlicher Infektion bisher in wenigen Fällen gelungen ist. Nur den Amerikanern Frey und Keitt, Keitt und Jones und Hamilton glückte es, künstliche Infektionen in größerem Maße in einer besonderen Infektionskammer zu erzielen. Als optimale Temperatur ermittelten sie 20° C. Diese Temperatur liegt um 3° höher als das von Wiesmann festgestellte Optimum für die Keimung der Askosporen. Bei unseren Beobachtungen war die Temperatur z. Z. des 1. Sporenfluges verhältnismäßig niedrig, während z. Z. des 2. Sporenfluges das Optimum für die Infektion teilweise sogar überschritten wurde.

Wir hatten gesehen, daß die Regenmengen z. Z. des Sporenfluges keine Bedeutung für die spätere Infektion hatten. Schon Aderhold beobachtete aber, daß der Schorfbefall um so höher war, je feuchter die für die Versuche verwendeten Bäumchen nach der künstlichen Infektion gehalten wurden. Auch Keitt und Jones berichten, daß der Schorfbefall am größten bei den Bäumchen war, die nach der Infektion am längsten in der feuchten Kammer verblieben. Auch unsere Freilandbeobachtungen deuten darauf hin, daß die Feuchtigkeit während der Inkubationszeit für die spätere Infektion von Wichtigkeit ist. Die Regenmenge während der Inkubationszeit betrug nach dem 1. Sporenflug in Zossen 6, in Lankwitz 3, in Dahlem 10,5 mm, nach dem 2. Sporenflug in Zossen 43,5, in Lankwitz 18,5 und in Dahlem 29,9 mm.

In Zossen, wo die größte Regenmenge während der Inkubationszeit zu verzeichnen war, war auch der stärkste Primärbefall festzustellen. Fast alle dort angepflanzten Sorten waren mehr oder weniger stark befallen. In Dahlem, mit den nächstniedrigeren Niederschlagsmengen, war der Befall auch wesentlich geringer. In Lankwitz hatten die Niederschläge während der Inkubationszeit nicht genügt, um die Krankheit zum Ausbruch kommen zu lassen. Fusicladium trat dort nur in einem Spalierobstgarten auf, der von drei Seiten von Häusern und Hecken umgeben war und in dem sich infolgedessen die Feuchtigkeit länger hielt.

Genauere Feststellungen über die unbedingt erforderlichen Niederschläge und die Rolle, die die Temperatur bei der Infektion spielt, lassen sich nur durch Gewächshaus- bzw. Laboratoriumsversuche machen, da man nur bei diesen Versuchen in der Lage ist, die beiden Faktoren in bestimmter Richtung zu variieren.

Mit Ausnahme von Dillon-Weston und Petherbridge haben bisher sämtliche Forscher Konidien erst nach dem Auftreten der ersten Rasen auf den Blättern in der Luft nachweisen können. Dillon-Weston und Petherbridge dagegen geben an, daß sie schon im

März Konidien und später im Mai die ersten Askosporen in der Luft gefunden haben. Die Verteilung der Konidien in der Luft wurde von uns ebenfalls in Zossen, Lankwitz und Dahlem beobachtet. Die Konidien wurden auf gleichen Sporenfängern wie die Askosporen gefangen. Im Jahre 1934 wurden Konidien in größerer Zahl nur 1½ Mon., vom 10. 5. bis Ende Juni, gefunden.

Die Ende Juni einsetzende Trockenheit verhinderte die Neubildung von Konidien. Die Feststellung von Frey und Keitt, Howitt und Evans und Wiesmann, daß Sporen nur bei Regen, wenn starker Wind herrschte, ermittelt wurden, konnten wir bestätigen. Vereinzelt wurden allerdings auch während der Trockenzeit von Ende Juni bis Ende Juli Konidien gefunden, aber nur nach starkem Wind. Es ist anzunehmen, daß diese Konidien durch mechanische Reibung der Blätter abgelost worden sind, denn nach den Versuchen von Wiesmann soll der Wind allein nicht genügen, um Konidien abzulösen. Bei unseren Versuchen konnten wir dann noch feststellen, daß die Konidien nicht über weite Strecken fortgetragen werden, denn im Obstgarten der Biologischen Reichsanstalt standen 3 Baumreihen in einer Entfernung von 8 m nebeneinander, von denen die erste stark, die 2. weniger, die 3. gar nicht befallen waren. An je 4 Bäumen der 3 Reihen waren Sporenfallen angebracht. Während des ganzen Sommers wurden auf den Sporenfängern der 3. Reihe niemals Konidien gefunden, obwohl die Sporenfänger von der 2. Reihe nur 4 m entfernt aufgehängt waren. Howitt und Evans konnten an Sporenfallen, die 20 m von einem Baum mit Konidienrasen angebracht waren, nur noch vereinzelt Konidien ermitteln, während Wiesmann nur noch in 10 m Entfernung bei ganz starkem Wind und Regen einzelne Konidien beobachtete. Die Feststellung, daß Konidien nicht weit zu fliegen vermögen, spricht dafür, daß die Konidien für die Verbreitung der Krankheit von Baum zu Baum keine große Rolle spielen. In Dahlem war es gelungen, durch eine Spritzung 2 Bäume fast vollständig vor der Primärinfektion zu schützen. Die Bäume standen zwischen stark befallenen Bäumen. Trotzdem trat auf ihnen eine wesentliche Vermehrung der Fusicladiumrasen während des Sommers nicht ein. Ein weiterer Fall, den wir beobachten konnten, spricht ebenfalls dafür, daß die Konidien größere Entfernungen nicht zurücklegen können. In Lankwitz wiesen an einem etwa 40 cm über dem Erdboden gezogenen Spalier etwa 80% der Blätter Primärflecken auf. Eine Vermehrung der Rasen erfolgte infolge der Trockenheit nicht. Während der Zeit waren Schößlinge senkrecht in die Höhe gewachsen und überragten das andere Laubwerk etwa 40 cm. Nach einem heftigen Regen am 9. 6. trat auf den Blättern mit Primärflecken ein starker Sekundärbefall auf, während an den Blättern der Schößlinge keine Fusicladiumflecken zu finden waren. Vielfach konnten wir an den Bäumen wie Loewel Infektionsbahnen beobachten, die von oben nach unten gingen und darauf hindeuteten, daß die Verbreitung der Konidien von Blatt zu Blatt durch den Regen erfolgt.

II. Die Bekämpfung des Fusicladiums.

Auf Grund seiner Untersuchungen über die Entwicklung des Fusicladiums kam bereits Aderhold zu der Ansicht, daß das Hauptgewicht der Bekämpfung auf die Spritzung vor der Blüte gelegt werden müsse. Bis dahin beschränkte man sich nämlich im wesentlichen auf eine Sommer-

spritzung. Nach Angabe von Loewel war es bis zum Kriege auch im „Niederelbischen Obstbaugebiet“ vielfach üblich, nur nach der Blüte mit 1 proz. Kupferkalkbrühe zu spritzen. In Deutschland hat man leider nicht die Untersuchungen von Aderhold bei den weiteren Bekämpfungsversuchen zugrunde gelegt, sondern hat sich darauf beschränkt, durch Spritzen zu verschiedenen Terminen vor der Blüte den günstigsten Zeitpunkt herauszufinden. Da man sich entweder an die Jahreszeit oder an die Entwicklung der Bäume hielt, ist es nicht verwunderlich, wenn es auf diese Weise nicht gelungen ist, in jedem Jahr bei der Bekämpfung des Fusicladiums befriedigende Ergebnisse zu erzielen. Neuerdings hat noch Loewel versucht, für das „Niederelbische Obstbaugebiet“ einen allgemein gültigen Spritzkalender festzulegen. Aber auch seine Versuche haben gezeigt, daß die Erfolge wechselnd sind, wenn man die Spritzungen nur nach dem Entwicklungszustand der Bäume ausführt. Auf Grund unserer Untersuchungen und den Ergebnissen früherer Forscher kommen wir zu dem Schluß, daß es auch in Deutschland nicht möglich ist, für ein Gebiet einen Spritzkalender aufzustellen, der für jedes Jahr Gültigkeit hat. Wir haben daher im Jahr 1934 versucht, zunächst den günstigsten Termin für die 1. Spritzung genauer zu ermitteln und zwar im Anschluß an die Beobachtung des Askosporenfluges.

Im Gegensatz zu deutschen Phytopathologen haben die Amerikaner ihren Untersuchungen die Ergebnisse von Aderhold zugrunde gelegt. So beobachteten Schneiderhan und Fromme bei ihren Bekämpfungsversuchen gleichzeitig den Askosporenflug. Sie konnten feststellen, daß der Erfolg der Vorblütenspritzung in Zusammenhang steht mit den zu dieser Zeit stattfindenden Askosporen-Aussaaten. An dem Gesamterfolg waren die einzelnen Spritzungen folgendermaßen beteiligt: Spritzung im Rötungsstadium der Blüten (pink spray) 50%, Spritzung nach dem Abfall der Blütenblätter (calyx spray) 25%, Spritzung 2 Wochen später 15%, Spritzung 5 Wochen später und Spritzung beim Aufbrechen der Blattknospen (delayed dormant spray) 10%. Auch Folsom und Ayers, die die Frage zu klären versuchten, ob 1 oder 2 Vorblütenspritzungen erforderlich sind, beobachteten nebenher die Aussaat der Askosporen. Ihre Versuche erstreckten sich über 2 Jahre und wurden in jedem Jahre nach demselben Plan durchgeführt. In der ersten Versuchsreihe wurde mit der Spritzung nach dem Aufbrechen der Blattknospen (Prepink), in der zweiten im Rötungsstadium der Blüten (pink) begonnen. 1926 war kein Unterschied in den beiden Versuchsreihen festzustellen. Anders war jedoch das Ergebnis 1927. Die erste Reihe ergab bei einer Sorte 10,2% Befall, bei der anderen 18,3%. die zweite Reihe bei der ersten Sorte 31,1, bei der zweiten Sorte 35,6%, während der Befall bei „Unbehandelt“ 91,7 bzw. 100% betrug. Die Unterschiede in den beiden Jahren waren auf Grund der Beobachtungen der Askosporen-Aussaat leicht zu erklären. 1926 hatte nämlich die Sporenaussaat zur Zeit der zweiten Spritzung eingesetzt, 1927 dagegen hatte sie schon zur Zeit der ersten Spritzung begonnen. 1926 hätte man also ohne Bedenken die erste Spritzung fortlassen können. Keitt und Jones konnten in 6jährigen Versuchen feststellen, daß die Sporenaussaat in jedem Jahr zu einer anderen Zeit begann und daß sie die Bäume in den verschiedensten Entwicklungsstadien von der geschlossenen Knospe bis zur vollen Blüte traf. Um auf jeden Fall einen sicheren Erfolg bei der Bekämpfung zu haben, empfehlen sie 3 Vorblütenspritzungen. Sie äußern die Ansicht, daß, wenn auch in diesem oder jenem Jahr eine oder 2 Spritzungen überflüssig wären, so wäre diese Bekämpfungsweise dennoch rentabel, weil sie in allen Fällen einen sicheren Erfolg verspräche.

In den bisher besprochenen Arbeiten ist der Nachweis erbracht worden, daß die Vorblütenspritzung eine außerordentliche Bedeutung für die Fusicladiumbekämpfung hat. Es geht aber aus ihnen nicht hervor, in welchem Zeitraum vor und nach der Sporenaussaat die Spritzung erfolgen muß, um den größten Erfolg zu haben. Zur Klärung dieser Frage hat zuerst Hamilton Versuche durchgeführt und zwar zunächst an künstlich infizierten Bäumchen im Gewächshaus und später auch im Freiland.

Die künstliche Infektion wurde in einer besonderen Infektionskammer vorgenommen. Die Spritzungen erfolgten in bestimmten Zeitabständen vor und nach der Infektion. Die Ergebnisse der Versuche von Hamilton sind in nachstehender Tabelle (5) wiedergegeben.

Tabelle 5.

Zeitpunkt der Spritzung	Fusicladium-Befall in % an Blättern	
	Kupferkalkbrühe	Schwefelkalkbrühe
3—5 Tage vor der Infektion .	50—100	1—2
24 Std. vor der Infektion . .	—	0
während der Infektion	3	0
12 Std. nach der Infektion . .	—	0
24 „ „ „ „ . .	—	0
48 „ „ „ „ . .	14—21	0—5
72 „ „ „ „ . .	51	5
4 Tage „ „ „ . .	—	22
8 „ „ „ „ . .	—	66

Die Spritzung mit Schwefelkalkbrühe hatte demnach recht gute Wirkung, wenn die Spritzung 3—5 Tage vor oder 3 Tage nach der Infektion ausgeführt wurde. Die Wirkung von Kupferkalkbrühe war wesentlich geringer, sie war 3—5 Tage vor und 2 Tage nach der Infektion nur noch in geringem Maße oder gar nicht wirksam. Dieses Ergebnis der geringeren Wirkung der Kupferkalkbrühe überrascht insofern, als man allgemein dieser Brühe bei der Fusicladium-Bekämpfung eine bessere Wirkung als der Schwefelkalkbrühe zuschreibt. Bei seinen Freilandversuchen verfolgte Hamilton die Sporenaussaaten an überwinterten Blättern. Die ersten Aussaaten ließ er unberücksichtigt und begann erst mit der Bekämpfung, als durch einen 37stünd. Regen die letzten Askosporen ausgeschleudert wurden. 43 Std. später erfolgte die Spritzung. Die Blütenblätter waren zu dieser Zeit schon abgefallen. Diese einmalige Spritzung mit Schwefelkalkbrühe 1 : 40 hatte sehr guten Erfolg. Bei einem Befall in „Unbehandelt“ von 99,7 bzw. 34,9% wiesen die einmal gespritzten Bäume nur 3,8 bzw. 3,1% Befall auf, während der Befall bei 7mal gespritzten Bäumen, bei denen die Spritzung aber ohne Berücksichtigung der Sporenaussaaten ausgeführt wurden, 9,6 bzw. 0,3% betrug. Als Hamilton im nächsten Jahre nochmals die gleichen Versuche anstellte und ebenfalls mit der ersten Spritzung wartete, bis die Sporenaussaaten beendet waren, hatten sich inzwischen schon Fusicladium-Rasen auf den Blättern gebildet. Der Erfolg der Spritzung war daher nicht erheblich.

Die Ergebnisse der Versuche von Hamilton zeigen also, daß nicht allein die Beobachtung des Sporenfluges sicheren Anhalt für den günstigsten Spritztermin gibt, daß vielmehr die klimatischen Bedingungen während des Sporenfluges unbedingt mit berücksichtigt werden müssen.

Tabelle 6.

In Dahlem: Es wurde an jedem Spritztermin je eine Reihe mit Schwefelkalkbrühe 2% und eine Reihe mit Kupferkalkbrühe 1% gespritzt.

Lfd. Nr.	Spritztermin	Tage nach dem 1. Askosporenflug (10. April)	Stadium der Bäume
1	14. April . .	4	Erscheinen der ersten Blättchen
2	17. April . .	7	Blütenknospen im Rötungsstadium
3	20. April . .	10	kurz vor dem Aufblühen
4	24. April . .	14 u. Zeit des 2. Askosporenfluges	ein Viertel der Blüten aufgeblüht
5	unbehandelt .	—	—

In Zossen: Es wurden an jedem Spritztermin je 2 Reihen mit Schwefelkalkbrühe 2% und 2 Reihen mit Kupferkalkbrühe 1% gespritzt.

Lfd. Nr.	Spritztermin	Tage nach dem 2. Askosporenflug (24. April)	Stadium der Baume
1	26. April . .	2	Blüten im Rötungsstadium
2	30. April . .	6	Vollblüte
3	11. Mai . . .	17	Früchte bis Haselnußgröße
4	14. Mai . . .	20	Früchte etwas größer als Haselnuß
5	unbehandelt .	—	—

Unsere eigenen Versuche wurden in denselben Gärten, in denen auch die Beobachtung des Sporenfluges erfolgte, vorgenommen. In Dahlem stand der Virginische Rosenapfel, in Zossen Goldparmäne zur Verfügung. Auf die Versuche in Lankwitz wird nicht näher eingegangen, da dort selbst an den nicht gespritzten Versuchsbäumen kein Fusicladium auftrat. Die Versuche wurden nach den in Tab. 6 dargestellten Plänen durchgeführt.

Die Wirkung der Spritzungen wurde zunächst nach dem Blattbefall beurteilt. Die Beobachtungen wurden in Dahlem mit dem 13. Juni und in Zossen mit dem 25. Juni abgebrochen, da nach dieser Zeit eine Vermehrung der Fusicladiumrasen nicht mehr beobachtet wurde. Die Feststellungen des Blattbefalles in Dahlem sind in der Tab. 7 dargestellt.

Die Befallstärke ist nach den Angaben von Ewert in Zahlen angegeben: 1 = schwacher, 2 = mäßiger, 3 = mittelstarker, 4 = starker, 5 = sehr starker Befall.

Tabelle 7.

Nr. des Planes	Blattbefall beobachtet am:									
	11. Mai		19. Mai		23. Mai		30. Mai		13. Juni	
	Cu[1])	S[2])	Cu	S	Cu	S	Cu	S	Cu	S
1	—	0,7	—	1,5	—	2,5	—	2,8	—	3,3
2	0,3	0,5	0,8	1,8	1,0	2,4	2,8	3,4	3,5	3,5
3	0,7	0,0	1,3	0,5	1,5	1,0	2,8	2,0	2,8	2,0
4	0,0	0,1	0,0	0,8	0,0	0,8	0,8	1,0	1,0	1,0
5	0,1	1,0	1,0	2,8	1,8	3,3	3,8	3,5	3,8	3,5

[1]) Cu = Kupferkalkbrühe 1%. [2]) S = Schwefelkalkbrühe 2%.

Die Behandlungen am 14. und 17. April, also 4 und 7 Tage nach dem Einsetzen des 1. Sporenfluges, hatten demnach kaum einen Erfolg gehabt. Der Befall setzte Anfang Mai bei ihnen ebenso wie bei „Unbehandelt" ein und hatte am Schluß der Beobachtungszeit den gleichen Grad erreicht. Einige Wirkung ließ die Spritzung am 20. 4., 4 Tage vor dem 2. Sporenflug, erkennen. Die Wirkung hielt sogar bis zum Schluß der Beobachtungszeit etwas an, und zwar übertraf die Schwefelkalkbrühe die Kupferkalkbrühe. Diese Beobachtung, die auch Hamilton machte, spricht dafür, daß der Schwefelkalkbrühe in der Hauptsache nur eine vorbeugende Wirkung zukommt. Auf diese Tatsache hat kürzlich auch Loewel hingewiesen. Der beste Erfolg wurde durch die Spritzung am 24. 4. z. Z. des maximalen Sporenfluges erzielt. Da der folgende Askosporenflug keine nennenswerte Infektion infolge der ungünstigen Bedingungen für die Entwicklung des Erregers hervorrief, konnte durch diese eine Spritzung die Krankheit von den Blättern fast

ferngehalten werden. Bemerkenswert ist, daß die Kupferkalkbrühe z. Z. des Hauptfluges gespritzt, eine bessere und anhaltendere Wirkung als die Schwefelkalkbrühe zeigte. Bei der Feststellung des Fruchtbefalls war die beste Wirkung der Spritzung z. Z. des Hauptfluges der Askosporen ebenfalls augenfällig. Die bessere Wirkung zeigte wiederum die Kupferkalkbrühe (Tab. 8.).

Tabelle 8.

Nr. des Planes	Befall der Fruchte in %	
	Kupferkalkbruhe	Schwefelkalkbruhe
1	—	58
2	32	55
3	52	44
4	22	36
5	52	70

Die Wirkung der Spritzungen auf den Blattbefall in Zossen ist aus Tab. 9 zu ersehen.

Tabelle 9.

Spritzung		Blattbefall beobachtet am:									
		14. 5.	17. 5.	22. 5.	24. 5.	28. 5.	31. 5.	4. 6.	11. 6.	18. 6.	25. 6.
26. 4.	Cu[1]	0	0	0,8	0,8	1,0	1,5	1,8	1,9	2,0	3,2
	Cu	0	0	0,3	0,8	1,0	1,5	1,5	1,5	1,8	3,0
	S[2]	0	0	0,5	0,5	1,0	1,5	1,5	2,5	2,5	3,2
	S	0	0	0,8	0,8	0,8	1,8	2,0	2,4	2,4	3,2
30. 4.	Cu	0	0,5	1,0	1,3	1,8	2,9	3,5	3,5	3,5	3,9
	Cu	0,2	0,6	1,0	2,0	2,4	2,8	2,9	2,9	2,9	3,0
	S	0	0,3	0,8	1,2	1,4	2,3	2,3	2,3	2,3	3,0
	S	0	0,4	0,9	1,0	1,0	1,3	1,5	1,8	2,0	3,0
11. 5.	Cu	0	0,4	0,5	1,7	2,0	2,3	2,4	2,4	2,4	2,8
	Cu	0,4	0,7	0,9	1,5	2,0	2,0	2,5	2,5	2,5	2,7
	S	0	0,5	0,9	1,4	2,4	2,4	2,4	2,4	2,4	3,0
	S	0,7	0,7	1,1	1,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	3,4
14. 5.	Cu	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	1,8	1,9	1,9	1,9	2,5
	Cu	0,3	0,5	0,5	1,9	3,0	3,0	3,0	3,0	3,0	3,2
	S	0,1	0,6	0,8	1,8	1,9	2,5	2,5	2,5	2,5	2,9
	S	0,5	0,9	2,3	2,8	3,0	3,4	3,5	3,5	3,5	4,0
unbehandelt		0,5	0,7	1,5	2,3	2,5	3,0	3,5	3,5	3,5	4,0

[1]) Cu = Kupferkalkbruhe 1proz. [2]) S = Schwefelkalkbruhe 2proz.

Die Spritzung z. Z. des Hauptfluges der Askosporen hatte also auch in Zossen den besten Erfolg. Die Spritzung, die etwa 6 Tage nach dem Hauptsporenflug vorgenommen wurde, schützte dagegen weniger. Vor allem ließ die Schwefelkalkbrühe kaum eine Wirkung erkennen. Da der 3. Sporenflug in Zossen wegen der günstigen Bedingungen, die nach dem Flug herrschten, noch erhebliche Infektionen hervorrief, dauerte die Wirkung der Spritzung nur bis etwa zum 7. Mai, da in dieser Versuchsreihe am 22. Mai stärkerer Befall beobachtet wurde. In Zossen wäre es also erforderlich gewesen, noch eine weitere Spritzung vorzunehmen, um die Infektion durch den 3. Sporen-

flug zu verhindern. Da diese aber absichtlich nicht vorgenommen wurde, um die Wirkung einer einzigen Spritzung zu ermitteln, nahm der Befall in dieser Versuchsreihe sehr stark zu, vor allem als auch die Konidien zur weiteren Verbreitung der Krankheit beitrugen.

Der Befall an den Früchten konnte in Zossen leider nicht ausgewertet werden, da die Ernte zu gering war.

Unsere Bekämpfungsversuche, die nur in einem Jahr durchgeführt sind, können natürlich noch keine abschließenden Ergebnisse haben, sie geben aber schon Anhaltspunkte dafür, daß sich durch die gleichzeitige Berücksichtigung des Verhaltens des Schorferregers und der klimatischen Faktoren die Bekämpfung sicherer gestalten läßt. Der Ansicht von Folsom und Ayers, daß die Beobachtung des Sporenfluges zu umständlich ist und daß es daher besser sei, nach einem festen Plan zu spritzen, können wir uns nicht anschließen; denn um mit einem bestimmten Spritzplane ohne Beobachtung des Erregers und der klimatischen Faktoren einen sicheren Erfolg zu haben, müßte man wie Keitt und Jones vor der Blüte drei Spritzungen mit einem fungiziden Mittel durchführen. Die Bekämpfung würde aber dadurch, zumal vorher vielfach eine Winterspritzung vorgenommen wird und noch mindestens 2 Nachblütenspritzungen hinzukommen, sehr kostspielig sein.

Ein Beispiel für die erfolgreiche Bekämpfung einer Pflanzenkrankheit nach der Beobachtung des Erregers und der klimatischen Verhältnisse haben wir bei der Bekämpfung der Rebenperonospora. Hier wird auf Grund der Beobachtung der Witterungsfaktoren von den Weinbauanstalten durch Bekanntmachungen in den Zeitungen — neuerdings auch durch den Rundfunk — der günstigste Termin für die Spritzungen angegeben. Vergleichen wir einmal die Entwicklung der Peronospora und die des Fusicladiums in großen Zügen. Beide Erreger überwintern zum erheblichen Teil in abgefallenen Blättern. Auf diesen werden die Verbreitungsorgane, Zoosporen bzw. Askosporen, nur bei Vorhandensein von Feuchtigkeit frei. Die Neuinfektion der Blätter erfolgt bei beiden Krankheiten ebenfalls nur in Gegenwart von Feuchtigkeit und am besten bei höheren Temperaturen. Niederschläge und Temperatur sind während der Inkubationszeit von großer Bedeutung. Bei Peronospora wissen wir, in welcher Weise diese beiden Faktoren die Entwicklung der Krankheit am günstigsten beeinflussen. Bei Fusicladium sind wir über die Verhältnisse noch nicht so eingehend unterrichtet. Die Kenntnis der Abhängigkeit der Entwicklung des Erregers von Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen während der Inkubationszeit ermöglicht es, bei der Bekämpfung der Peronospora die Spritzung festzulegen bzw. anzugeben, bis wann unbedingt die Spritzung durchgeführt sein muß. Es genügt bei der Peronospora, die Spritzung nach erfolgter Infektion vor dem Ausbruch der Pilzrasen vorzunehmen. Nach den bisherigen Untersuchungen erscheint es fraglich, ob bei Fusicladium längere Zeit nach erfolgter Infektion die Spritzung noch einen Ausbruch der Krankheit verhindern kann. Die Untersuchung dieser Frage und die genauere Feststellung der günstigsten klimatischen Bedingungen für die Infektion und die Entwicklung des Fusicladiums sollen unsere nächste Aufgabe sein. Der Vergleich mit der Peronospora läßt es durchaus als aussichtsreich erscheinen, auch die Bekämpfung des Fusicladiums durch Beobachtung des Erregers unter Berücksichtigung der für seine Entwicklung günstigen klimatischen Bedingungen sicherer zu gestalten.

Zusammenfassung.

Die Beobachtung der Entwicklung der Perithezien des Apfelschorfpilzes an abgefallenen Blättern zeigte, daß die Entwicklung nicht nur bei verschiedenen Sorten, sondern auch bei der gleichen Sorte verschiedener Herkunft verschieden schnell vor sich geht. Dementsprechend beginnt die Askosporenaussaat auch nicht zu gleicher Zeit. Sie erfolgt nur nach Regen und ist unabhängig von der herrschenden Temperatur.

Askosporen wurden in der Luft ebenfalls nur nach Regen gefunden.

Im Jahr 1934 setzte an 3 verschiedenen Beobachtungsstellen der erste Askosporenflug am 10. 4. ein. Zur gleichen Zeit wurden die ersten Sporenaussaaten auf überwinterten Blättern ermittelt. Der 2. Sporenflug dauerte vom 20.—30. 4.; der 3. begann an 2 Stellen Anfang Mai und war am 20. 5. abgeschlossen, an einer Stelle wurde er erst im letzten Drittel des Mai beobachtet.

Die Zahl der gefangenen Askosporen war nicht von der Höhe der Niederschläge abhängig.

Die Infektion erfolgte beim 2. Askosporenflug kurz vor der Blüte. Zu dieser Zeit war die Temperatur höher als z. Z. des 1. Sporenfluges.

Der Ausbruch der Krankheit nach dem 2. Sporenflug wurde durch höhere Niederschläge während der Inkubationszeit begünstigt.

Konidien wurden erst nach dem Auftreten von Rasen auf den Blättern nach dem 10. 5. gefunden.

Eine Verbreitung des Fusicladiums von Baum zu Baum durch Konidien konnte nicht beobachtet werden.

Spritzungen hatten den größten Erfolg, wenn sie z. Z. des Hauptsporenfluges (2. Flug) ausgeführt wurden. An einer Versuchsstelle war der Erfolg jedoch nicht andauernd, weil z. Z. des 3. Sporenfluges günstige Bedingungen für die Neuinfektion herrschten.

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft, die durch ihre Unterstützung diese Untersuchungen ermöglichte, sprechen wir unseren verbindlichsten Dank aus. Ebenso danken wir der Frau Oberin der Wernerschule vom Roten Kreuz in Berlin-Lankwitz und Herrn Welter, Zossen, die ihre Obstgärten für die Versuche bereitstellten und auch sonst unsere Versuche in jeder Weise förderten.

Literatur-Verzeichnis.

Aderhold, R., Die Fusicladien unserer Obstbäume. I. Teil. (Landw. Jahrbücher. Bd. 25. 1896. S. 875—914); II. Teil. (Ibid. Bd. 29. 1900. S. 541—588.) — Bremer, G., Das Auftreten der Schorfkrankheit an Apfelbäumen (Fusicladium dendriticum Wallr.) in seinen Beziehungen zum Wetter. (Angew. Bot. Bd. 6. 1924. S. 77—97.) — Dillon-Weston, A. R. W., and Petherbridge, F., Apple and pear scab in East-Anglia. (Cambridge Agr. Journ. of Pomol. Vol. 11. 1933. p. 185—198.) — Ewert, R., Der Einfluß des Fusicladiums auf den Laubabfall. (Landw. Jahrbücher (Ergänzungsband). Bd. 48. 1915. S. 157.) — Folsom, O., and Ayers, Th. T., Apple spraying experiments in 1926—1927. (Maine Agr. Exp. Sta. Orono Bull. 348. 1928. p. 145—176.) — Frey, C. N., and Keitt, G. W., Studies of spore dissemination of Venturia inaequalis in relation to seasonal development of apple scab. (Journ. of Agr. Res. Vol. 30. 1925. p. 529—540.) — Hamilton, I. M., Studies of the fungicidal action of certain dusts and sprays in the control of apple scab. (Phytopath. Vol. 21. 1931. p. 445—523.) — Hamilton, I. M., Recent investigations on the control of apple scab in the Hudson Valley. (New York Agr. Exp. Sta. Bull. 604. 1932. p. 1—44.) — Hockey, I. F., Seasonal development of the apple scab fungus (Venturia inaequalis). (Dom. of Canada Dep. Div. Bot. 1930. p. 103—105.) — Howitt, I. F., and Evans, W. G., Primilary report of some observations in ascospore discharge and dispersal of conidia of Venturia inaequalis. (Phytopath. Vol. 16. 1926. p. 559—563.) —

Keitt, G. W., and Jones, L. K., Studies of epidemiology and control of apple scab. (Agr. Exp. Sta. Univ. of Wisconsin Res. Bull. 73. 1926. p. 1—104.) — Keitt, G. W., Studies of apple scab and sherry leaf spot infection under controlled conditions. (Phytopath. Vol. 17. 1927. p. 45.) — Kent, W. G., A commercial apple spraying demonstration 1932. (Journ. of Ministry. Vol. 40. 1933. p. 420—430.) — Loewel, E. L., Das Auftreten des Fusicladiums im Altlander Obstgebiet und seine Abhängigkeit von Klima, Standort, Obstarten und -sorten und seine praktische Bekämpfung auf Grund zweijähriger Versuche des Obstbau-Versuchsringes. (Angew. Bot. Bd. 14. 1932. S. 233—277, 281—333.) — Loewel, E. L., Der augenblickliche Stand der Mittelfrage in der Fusicladium-Bekämpfung im niederelbischen Obstbaugebiet. (Gartenbauwissenschaft. Bd. 8. 1934. S. 124—134.) — Ludwigs, K., Das Fusicladium in seiner Abhängigkeit von Klima, Standort, Obstarten und -sorten. (Obst- und Gemüsebau. Jahrg. 79. 1933. S. 101—102.) — Rudloff, C. F., Venturia inaequalis (Cooke) Aderhold. I. Der Einfluß des Nährbodens auf den Pilz und die Erhaltung seiner Pathogenität. (Gartenbauwiss. Bd. 9. 1934. S. 65—91.) — Schneiderhan, F. I., and Fromme, F. D., Apple scab and its control in Virginia. (Virginia Agr. Exp. Sta. Bull. 236. 1924. p. 1—29.) — Wallace, E., Scab disease of apple. (Cornell Univ. of Agr. Exp. Sta. Bull. 335. 1913. p. 545—624.) — Wiesmann, R., Untersuchungen über die Überwinterung des Apfelschorfpilzes im toten Blatt sowie die Ausbreitung der Sommersporen des Apfelschorfpilzes. (Landw. Jahrbücher der Schweiz. 1932. S. 619—679.)

Nachdruck verboten.

Vorkommen und Tätigkeit der Hefen in der Milch.

[Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie und Bodenkunde der Universität Leipzig.]

Von **Hans Glathe.**

Die in der Milch vorkommenden Hefen gehören in erster Linie der Gruppe Torula an[1]). Im allgemeinen beeinflussen sie durch die Bildung von Estern das Aroma der Molkereiprodukte; in einzelnen Erzeugnissen, speziell bei solchen orientalischer Herkunft, werden sie zwecks Alkoholbildung eingeimpft[2]). In den meisten Milchsorten kommen Hefen vor, ohne jedoch eine bestimmte Tätigkeit zu entfalten[3]). Sehr unheilvoll können gasbildende Hefen werden, wenn sie, speziell bei Büchsenmilch, die Gefäße zersprengen oder starke Blähungen in Hartkäsen erzeugen. Sie können aber auch noch aus anderen Gründen unerwünscht sein, wie folgendes Beispiel zeigen mag.

Im November 1933 traten in einem Bauerngute in der Nähe von Leipzig Störungen bei der Butterbereitung auf. Die zum Ausschleudern des Butterfettes erforderliche Zeit stieg zunächst langsam an, dann immer schneller, bis es nach Verlauf einiger Wochen trotz 12stündiger Bemühungen nicht mehr gelang, ein auch nur einigermaßen festes Produkt zu erzeugen. Nach kurzer Zeit war der Innenraum des Handbutterfasses mit großporigem Schaum erfüllt. Nur ein geringer Prozentsatz des zu erwartenden Butterquantums wurde als zähflüssige Masse von unangenehmem Geruch und Geschmack erzielt.

Der Landwirt schickte zunächst Milch zur Untersuchung ein, die jedoch keinerlei Anhaltspunkte für die Ursache der Störung erkennen ließ. Die Untersuchung der Milch aus dem im Stall verwendeten Sammelgefäß för-

1) Winkler, Handb. d. Milchwirtschaft. Bd. 1. Teil I. S. 151.
2) Ibid. S. 193.
3) Nelson, Journ. of Dairy Science. Vol. 11. 1928. p. 397—400.

Lfde. Nr.	Kolonieform	Mikroskopisches Bild	Laktose	Maltose	Glukose	Milch	Bierwürze	Einordnung
1	Matte Ausläufer bildende Kolonien	Große, ovale Hefen	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert	Hautbildung	Mycoderma
2	Trockenes, häutiges Wachstum. Weiße Kolonien	Große, runde und ovale Hefen	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert	Hautbildung	Mycoderma
3	Rosa, fettig-glänzende Kolonie	Kleine, runde Hefen	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert	Keine Hautbildung	Torula
4	Matte, obstesterbildende Kolonien. Rasenartiges Wachstum	Ovale, mittelgroße Hefen	Wachstum, Haut	Wachstum, Haut	Wachstum, Haut	Unverändert	Haut	Mycoderma
5	Fettig-glanzende weiße Kolonie	Kleine, ovale Hefen	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert	Keine Hautbildung	Torula
6	Schwach-glänzende, weiße Kolonie	Kleine, ovale Hefen. Sporen	Wachstum, stürmische Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, Gärung	Unverändert. Gas	Bodensatz	Saccharomyces
7	Schwach-glänzende Kolonie	Große, ovale Hefen. Sporen	Wachstum, Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert. Gas	Bodensatz	Saccharomyces
8	Trockene, schwach-glänzende Kolonie	Sehr große, ovale Hefen. Sporen	Wachstum, Gärung	Wachstum, Gärung	Wachstum, keine Gärung	Koaguliert	Hautbildung	Willia
9	Matte, faltenbildende Kolonie	Sehr große, ovale Hefen	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Wachstum, keine Gärung	Unverändert	Hautbildung	Mycoderma

derte neben den verschiedensten Bakterienarten Hefen in größerer Zahl zutage. Bei der Untersuchung des Rahms wurden Hefen in wesentlich größerem Umfange nachgewiesen. Die Reaktion des Rahms war schwach sauer (6,06). Wahrscheinlich ist die außerordentlich langsame Säuerung darauf zurückzuführen, daß die Hefen die Milchsäure als C-Quelle benutzten, wie das auch von E. A. Sandelin [1]) als wahrscheinlich angesehen worden war, und so eine normale Säuerung verhinderten. Hiermit ist jedoch das Schäumen im Butterfaß noch nicht erklärt. Um auch hier Klarheit zu schaffen, wurde eine Identifikation der isolierten Arten in ähnlicher Weise vorgenommen, wie es H. Will [2]) getan hat. Spezielle Angaben werden in der Tabelle gebracht. Echte Gärungserreger wurden mit Sicherheit nachgewiesen, und somit läßt sich die Schaumbildung im Butterfaß auf die CO_2-Bildung durch die Hefen zurückführen.

Der Fehler wurde durch eine gründliche Desinfektion beseitigt. Mit Hilfe einwandfrei arbeitender Rahmreifungskulturen konnte eine Butter gewonnen werden, die allen Anforderungen genügte.

Dem Landwirt ist nun zwar mit einer Beseitigung des Fehlers geholfen, aber er muß, um sich vor ähnlichen Fällen in Zukunft schützen zu können, Aufschluß über die Entstehung der Infektion bekommen. Zu diesem Zweck wurden Proben von allen Stoffen untersucht, die in irgendeiner Weise mit der Milch in Berührung kamen.

Unter „möglichst" sterilen Bedingungen entnommene Milch hatte normalen Fettgehalt und war ausgezeichnet haltbar. Vom Sammelgefäß an bis zum Butterfaß konnte eine langsame Zunahme der Zahl der Hefen festgestellt werden. Die Infektion erfolgte im Sammelgefäß, das an den Nahtstellen beschädigt war. In den kleinen Vertiefungen hatten sich Rückstände halten können, die bei näherer Untersuchung aus einer Anhäufung von Hefezellen bestanden.

Nachdem nun die Infektionsquelle bekannt war, mußte noch die Frage geklärt werden, auf welchem Wege die Hefen in das Sammelgefäß gelangt waren. Da die Infektion schon längere Zeit zurücklag, wurden die Nachforschungen auf breiterer Basis angestellt. Euter, Haarkleid, Exkremente, Stalldünger und Wasser der Selbsttränke wurden geprüft. Hefen fanden sich nur im Tränkwasser, und zwar in größerer Menge. Es lag also nahe, daß die Infektion von hier aus erfolgt war. Der Verdacht wurde dadurch gestützt, daß vor dem Auftreten der Störung Fallobst gefüttert worden war; dabei können Futterreste im Trog geblieben und in Gärung übergegangen sein.

Zusammenfassung.

1. Echte Hefen verursachten Störungen in der Butterbereitung.

2. Die Störung konnte durch Desinfektion augenblicklich behoben werden.

3. Die Gärungserreger hatten sich in den Tränkbecken angereichert und waren offenbar von hier aus in die Milch gelangt.

4. Die Anreicherung der Hefen dürfte auf Obstfütterung zurückzuführen sein.

[1]) E. A. Sandelin, Ann. acad. scient. Fenn. Ser. A. Vol. 19. 1921; ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 58. 1923. S. 132.

[2]) H. Will, in Lafar, Handb. d. techn. Mykologie. Bd. 4. 1905—1907. S. 280—302.

Referate.

Allgemeines und Methodisches.

Koch, F. E., Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen. Zeresin-Verschluß — Trockene Pottasche — Pyrogallol — Wachstum von Leptothrix, Aktinomyces, Fusiformis, Pneumosintes und anderen Anaerobiern. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 358—365.)

Das Pyrogallolverfahren ist erst vollwertig geworden, seitdem Ritter und Dorner die Alkalisierung mit Natronlauge durch Sodalösung ersetzt haben, wodurch die für viele Anaerobier lebensnotwendige Kohlensäure erhalten bleibt. Diese Methode wurde bisher nur für Weiterzüchtung auf Schrägagar verwendet. In der vorliegenden Arbeit wird ein Verfahren mit „Trockenem Pottasche-Pyrogallol" geschildert, bei dem die Reagentien unter Verwendung von kleinen Taschen aus Filtrierpapier in der Petrischale selbst so untergebracht werden, daß diese zur Besichtigung der gewachsenen Kolonien nicht geöffnet zu werden braucht. Pottasche reagiert als Kalisalz schneller und anscheinend auch gründlicher als Soda, z. B. wuchs Bac. botulinus meist innerhalb von 24 Std. Zum anaeroben Verschließen der Petrischalen wird gelbes Zeresin empfohlen. Die Methode eignet sich sowohl für die Weiterzüchtung, als auch für die Isolierung von Anaerobiern aus Untersuchungsmaterial. So gelang neben den gewöhnlichen Anaerobiern ohne Vorkultur die Züchtung von Bact. fusiforme, Leptothrix, Pneumosintes aus Eiter (die drei ersten bisher bekannten Fälle), Aktinomyces und einigen bisher nicht bekannten gramnegativen Bakterien. Die besonderen Vorteile des Verfahrens bestehen in gutem Wachstum aller geprüften Anaerobier (auch bei direkter Kultur), Einfachheit, Sauberkeit, Billigkeit, Schnelligkeit. Die Verbrauchskosten sind sehr gering. Als Nährboden diente meist gewöhnlicher 5 proz. Schafblutagar, der vor der Beimpfung meist 48 Std. bei 37° auf Sterilität geprüft wurde, wodurch zugleich zu reichliches Kondenswasser vermieden wurde. Zeißlerplatten (Menschenblut) wurden schneller unansehnlich und ließen manche Anaerobier früher absterben. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Bachmann, W., Experimenteller Beitrag zur anaeroben Oberflächenkultur. I. Mitt. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 366—378.)

Wenn an Stelle von Bact. prodigiosum verschiedene Hefestämme und Bact. coli als Sauerstoffverzehrer für die anaerobe Oberflächenkultur Verwendung fanden, so ergab sich in keinem Falle regelmäßig optimales Anaerobierwachstum, während mit Bact. prodigiosum durchweg gute anaerobe Züchtungsergebnisse erzielt wurden. Dagegen erwies sich je ein Stamm von Bäcker- und Milchhefe als guter Sauerstoffverzehrer, wenn die Hefe in Symbiose mit einem Stamm von Staphylococcus aureus (vermischt oder getrennt, aber in bestimmtem Mengenverhältnis) das Bact. prodigiosum in der Fortner-Anordnung vertrat. Unter den aus theoretischen Gründen möglichen Voraussetzungen, daß ein die Anaerobier schädigendes gasförmiges Produkt des Hefestoffwechsels durch Na_2SO_3 neutralisierbar ist, wurden die betreffenden Hefestämme in der Weise als Sauerstoffverzehrer verwendet, daß gleichzeitig eine mit ge-

sättigter Natriumsulfitlösung getränkte Fließpapierscheibe innerhalb der Fortner-Kulturen auf die Abschlußscheibe gelegt wurde. Und tatsächlich gediehen die geprüften Anaerobier meist gut bis sehr gut, am besten auf unfiltriertem Levinthal-Agar. Dieser Erfolg beruht auf der Wegnahme von Aldehyden, die im Hefestoffwechsel entstanden. Unter Verwendung bakterieller Sauerstoffverzehrer (Staphylokokken, Coli, Prodigiosum) bewährten sich unter denselben Bedingungen (+ Na_2SO_3) Coli und Prodigiosum am besten. Auf filtriertem Levinthal-Agar war das Wachstum der Anaerobier mit Prodigiosum als Sauerstoffverzehrer + Na_2SO_3 sogar optimal, während in den Kontrollen ohne Na_2SO_3 meist kein Wachstum eintrat. Auf gewöhnlichem Agar fielen die Resultate auch unter Verwendung von Na_2SO_3 und Prodigiosum unbefriedigend aus. Dagegen ergab sich gutes bzw. sehr gutes anaerobes Wachstum auf Schafblutagar und unfiltriertem Levinthal-Agar, wenn Bact. coli und Bact. prodigiosum statt mit gesättigter mit 20- oder 30 proz. Natriumsulfitlösung als Sauerstoffverzehrer Verwendung fanden, während Bäcker- und Milchhefe unter diesen Bedingungen nur auf unfiltriertem Levinthal-Agar einzelne Anaerobier gedeihen ließen. — Im Verlauf anderer chemischer Voruntersuchungen über die mikrobiologischen Grundlagen des beschriebenen Prinzips der Anaerobiose stellte Hettche fest, daß Ferrohydroxyd, in dicker Schicht auf Fließpapier innerhalb eines Fortner-Systems aufgebracht, sowohl in Verbindung mit einem Sauerstoffverzehrer wie für sich allein, auf geeigneten Nährböden ausgezeichnete anaerobe Wachstumsbedingungen herstellt. — Eine Nachprüfung und erweiterte Anwendung des von Ritter und Dorner empfohlenen Pyrogallol-Soda-Verfahrens hat dessen Brauchbarkeit auch für das Plattenverfahren, nicht nur für Schrägblutagar, in vollem Umfange bestätigen können.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Sander, F., Bakterienfärbung durch Kaliumpermanganat; zugleich eine einfache Sporenfärbung. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 335—336.)

Mikroorganismen lassen sich mit Kaliumpermanganatlösung färberisch darstellen, wobei besonders Substanzdichteunterschiede gut in Erscheinung treten. Bei Färbung auf kaltem Wege (nach Ausstrich auf Objektträger und Hitzefixation wie üblich) kann man sowohl alkalische wie auch saure Lösungen verwenden. Man erhält dann bei 2 Min. nicht überschreitender Zeitdauer des Einwirkenlassens der Kaliumpermanganatlösung im wesentlichen eine Hüllenfärbung. Die Bakterien erscheinen in gelbem Farbton mit dunklerer Umrandung. Zur Darstellung von Dichteunterschieden im Innern der Mikroorganismen muß man entweder wesentlich länger in der Kälte einwirken lassen oder kurz erhitzen. In diesem Fall verwendet man zweckmäßig wäßrige oder saure Lösungen (vor allem 1 proz. schwefelsaure Lösung von gesättigtem Kaliumpermanganat), weil im alkalischen Milieu die Bakterien leicht vom Objektträger abgelöst werden, was in neutraler oder saurer Lösung nicht der Fall ist. Störende diffuse Braunsteinniederschläge treten bei Erhitzung, wenn man mit sauberen Objektträgern und reinen Bakterienausstrichen von Plattenkulturen arbeitet, praktisch nicht auf im Gegensatz zu Metallsalz-, z. B. Silberfärbungen. Die saure 1 proz. Lösung empfiehlt sich auch für Sporen- und Kernfärbungen. Man erhitzt für diese Fälle 2 Min. mit der Flamme, spült mit Leitungswasser ab und trocknet zwischen Filtrierpapier. Die Stäbchen erscheinen gelb, die Sporen braun. Bei Hefezellen

tritt eine sehr schön sichtbare braune Kernfärbung mit der ihn umgebenden Nukleoproteinmasse auf gelbem Grund in Erscheinung. Als Sporenfärbung hat diese Methode vor allen anderen Sporenfärbungen den Vorzug der Einfachheit und Schnelligkeit. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Priebe, K., Über zwei neue Apparate für bakteriologische Laboratorien. (Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamte. Bd. 66. 1933. S. 629—631.)

Beschreibung eines Thermostaten und Wasserbades (Hersteller: Fa. E. F. G. Küster, Berlin N 65), beide für verschiedene Zwecke verwendbar. Der Thermostat ermöglicht durch Verwendung einer Ölfüllung (Paraff. liquid.) jede Temperatur von 25—120° zu erreichen und beliebig lange zu halten. Besonderes Augenmerk ist auf eine zuverlässig und leicht auf die verschiedenen Temperaturen einstellbare Regulierung gelegt. Der ganz aus Metall hergestellte Thermoregulator besitzt eine große Skalenscheibe mit den in Betracht kommenden Temperaturmarken. Bei Verwendung des Apparates als Brutschrank bis zu 37° wird der Regler durch Kabel und Stecker an eine Heizpatrone gelegt, während bei höheren Temperaturen auf einfachste Weise eine entsprechend starke Bodenheizung über ein Relais durch den Regler geschaltet wird. Das Wasserbad ist aus Kupfer hergestellt und faßt 36 Reagenzgläser. Zwecks guter Wärmehaltung ist es mit einem feueremaillierten Schutzmantel versehen. Im Gegensatz zu den sonst gebräuchlichen Wasserbädern besitzt es noch ein besonderes Wärmeschutzdach. Dieses läßt die Wassertemperaturen leichter konstant halten. Durch seine halbkugelige Form wird das Abtropfen von Kondenswasser auf die Reagenzgläser verhindert. Zur automatischen Temperaturregulierung ist ein Präzisionsthermoregulator (Modell „Thermofix") vorgesehen. Der Regulator läßt sich in bequemster Weise und sehr genau auf Betriebstemperaturen zwischen 37 und 60° einstellen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Manigold, K., Über die überlebenden Bazillen in Sterilisationsproben. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 112. 1934. S. 314—318.)

Es werden 2 Bazillenarten beschrieben, die die üblichen Sterilisationsverfahren häufig überstanden und etwa zwei Drittel der unsterilen Befunde ausmachten. Hauptmerkmale dieser Bazillen sind feines Wachstum (insbesondere in Nährflüssigkeiten) und entsprechend der Schädigung durch die vorangegangene Sterilisation langsames Erscheinen. Daraus erklärt es sich, daß vielfach die durch diese Bazillen bedingte Unsterilität übersehen worden ist. Die Kultursporen der einen Art (besonders fein wachsend) vertrugen strömenden Dampf bis zu 240 Min., eine bisher noch nicht beobachtete Zeit. Im übrigen schien es sich um eine in gewisser Hinsicht dem Bac. sphaericus oder Bac. alvei nahestehende Art zu handeln, doch fehlte ihr das Gelatineverflüssigungsvermögen (und anderseits beträgt die Hitzeresistenz jener 2 Arten gegenüber strömendem Dampf höchstens 8 Min.). Die gröber wachsende Art wurde nach 25 Min. im strömenden Dampf abgetötet und stand kulturell dem Bac. silvaticus und Bac. pumilis nahe. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Sander, F., Einige Vorschläge für Schutzvorrichtungen in bakteriologischen Laboratorien. (Arch. f. Hyg. u. Bakt. Bd. 112. 1934. S. 342—348.)

Beschreibung einer Pipettiervorrichtung, die auf dem Zylinder-Kolben-System beruht, also vollständig sterilisierbar ist. Die Konstruktion ist allerdings wesentlich vielteiliger als die bisher bekannten, soll aber sicherer und bequemer arbeiten. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Konrich, F., Über die neuzeitlichen Grundlagen und praktische Ausführung der Sterilisation mit besonderer Berücksichtigung des Apothekenbetriebes. (Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamts. Bd. 66. 1933. S. 51—63.)

Die keimtötende Kraft des Dampfes nimmt bei Temperaturen über 100° zunächst nur langsam zu, dann aber plötzlich sehr schnell, um von 120° an wieder viel weniger Zunahme zu erfahren. Man ist deshalb dazu übergegangen, die Sterilisation einheitlich durch Dampf (poröses Gut) oder feuchte Wärme (Lösungen) von 120° vorzunehmen, sie also zu „normen", weil die Sterilisiertestsporen bei dieser Temperatur in höchstens 5—7 Min. zugrunde gehen und einerseits niedrigere Temperaturen zu langsam arbeiten, höhere aber keinen Gewinn mehr bringen; es lohnt nicht, eine Absterbezeit von 5 bis 7 Min. zu unterbieten. — Für die Bauweise der Sterilisatoren ist von grundsätzlicher Bedeutung die Notwendigkeit, die Luft besonders aus porösem Sterilisiergut zu entfernen. Luftbeimengung zum Dampf schwächt bekanntlich dessen keimtötende Kraft. Nun wird die Entfernung der Luft und ihr Ersatz durch Dampf einzig und allein durch das verschiedene spezifische Gewicht beider Gase bewirkt, die Spannung des Dampfes und die damit parallel gehende Temperatur haben darauf keinerlei Einfluß. Da Luft etwa ein Drittel mal so schwer ist wie Dampf, müssen die Autoklaven, wenigstens für poröses Gut, die Dampfzufuhr oben und den Luftablaß unten haben. Allgemein besteht die Auffassung, daß, sobald das im Luftablaß steckende Thermometer 100° erreicht hat, die Dampfkammer luftfrei sei. Dies gilt lediglich für nicht poröses Gut. Soweit es sich um poröses Gut handelt, ist die Annahme irrig. Es ist in diesem Falle vollkommen falsch, den Lufthahn zu diesem Zeitpunkt zu schließen. Häufig kommt es überhaupt nicht zu völlig luftfreiem Dampf, doch sind geringe Restmengen unschädlich. Der Lufthahn darf deshalb bei Sterilisierung porösen Gutes vom 100°-Punkt ab nur soweit gedrosselt werden, daß während der ganzen Sterilisation stets etwas Dampf und mit ihm die Luft entweicht (den austretenden Dampf schlägt man zweckmäßig durch einen Kondensator nieder). Im übrigen ist bei Sterilisierungen zu beachten, daß nicht gleichzeitig ganz dickwandige große und viel kleinere Flaschen mit Lösungen autoklaviert werden, weil der Inhalt der letzteren dann unnütz lange unter Wärmewirkung steht. Zu vermeiden ist ebenso die gleichzeitige Sterilisation gleich großer Flüssigkeitsbehälter, wenn sie sich in der Beschaffenheit stark unterscheiden (Flaschen mit und ohne Metallhüllen); denn diese Verschiedenheit bedingt sterilisatorisch verschiedene Eigenschaften. — Noch eine Bemerkung über die Sterilisation im Heißluftschrank. Die Erhitzung von Glas, Porzellan und Metall auf 160° für 2 Std. führt nicht sicher zum Ziel, sie liegt erst an der Sicherheitsgrenze. Man kann sich in der Weise helfen, daß man in alle Gegenstände einen Streifen weißen Fließpapiers einlegt; seine kräftige Bräunung zeigt sichere Keimfreiheit an.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Konrich, F., Über Dampfsterilisatoren mit Luftabscheider. (Arbeiten aus dem Reichsgesundheitsamt. Bd. 66. 1933. S. 433—447.)

Sterilisierapparate mit Luftabscheider weisen gegenüber den bisherigen Sterilisatoren zwei besondere Vorzüge auf: wesentliche Ersparnis an Wärme und größtmögliche Sicherheit im Sterilisiererfolg. Als sehr zweckmäßig hat sich erwiesen, Luftventil und Gas- bzw. Dampfventil so miteinander zu kuppeln, daß erst das Luftventil geöffnet werden muß, bevor das Gas- oder Dampfventil geöffnet werden kann. Da nur noch 2 Ventile vorhanden, kann auch ein Ungeübter den Apparat ohne weiteres bedienen. Nur eine einzige Störung ist denkbar, die aber allen Sterilisieranlagen anhaftet, daß nämlich die Wärmezufuhr ungenügend ist oder während der Sterilisation unzureichend wird. Gegen die Folgen dieser Versagens schützt man sich am besten durch einen Thermographen, der den Dampfdruck selbsttätig aufschreibt. Das

Thermogramm ergibt mit einem Blick, wie die Temperatur während der Sterilisation verlaufen ist.

Nicht minder zweckmäßig sind einfache, in der Form der Weckuhren gehaltene Zeitmesser, die nach bestimmter Zeit ein lautes Hörzeichen geben. Das Gerät wird auf die Minutenzahl eingestellt, die ein Sterilisiervorgang vom Erreichen des 100°-Punktes an benötigt, und zu diesem Zeitpunkt in Gang gesetzt. Man kann dann unbekümmert anderer Arbeit nachgehen und wird durch das Klingelzeichen gerufen, wenn die Sterilisation beendet ist. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Wilman, G., Eine neue einfache Methode zum Nachweis säurefester Stäbchen im Zentrifugat. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 13. 1934. S. 1591.)

An Stelle der üblichen Spitzgläser, die zur Anreicherung von Tuberkelbazillen und anderen Mikroorganismen verwendet werden, empfiehlt Verf. größere Zentrifugengläser mit flachem Boden und einer als Objektträger dienenden Bodenplatte. Bei Anwendung eines solchen Objektträgers gelangt ein bedeutend größerer Teil des Zentrifugates zur Färbung und Durchmusterung. Bei den gewöhnlichen Spitzgläsern kommen ja oft die untersten Schichten des Zentrifugates, die sicherlich die wertvollsten sind, gar nicht zur Untersuchung, weil sie mit einer gewissen Kraft dem Boden des Zentrifugierglases anhaften. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Ruf, H., Die oligodynamische Wirkung der Metalle durch Luftschichten. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 112. 1934. S. 333—341.)

Die bisher beobachtete oligodynamische Fernwirkung der Metalle durch geringe Luftschichten ist noch nicht einwandfrei bewiesen worden. Auch bei der Nachprüfung der neuerdings von Nadson und Stern beobachteten bakteriziden Fernwirkung der Metalle (in 15 Versuchsreihen wurden Al, Cu, Pb, Ag und Pt untersucht) zeigte sich unter verschiedenen Versuchsbedingungen keine Wirkung. Die Annahme von Nadson und Stern, wonach ihre Ergebnisse auf Elektronenemission der Metalle zurückzuführen sei, entbehrt jeder physikalischen Grundlage. Eine Elektronenwirkung durch eine Luftschicht von 1—3 mm ist ganz unwahrscheinlich.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Gara, P. v., Untersuchungen über die Wirkung von „Kölnisch-Wasser" auf Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 110—119.)

Die Untersuchung von 7 verschiedenen „Kölnisch-Wasser"-Fabrikaten ergab, daß dem unverdünnten „Kölnisch-Wasser" eine außerordentlich hohe bakterizide Kraft in vitro zukommt. Auch außerordentlich große Keimmengen und selbst Sporen (Bac. subtilis) wurden augenblicklich abgetötet. Verdünnung von „Kölnisch-Wasser" mit sterilisiertem Leitungswasser hatte eine beträchtliche Verminderung der bakteriziden Wirksamkeit zur Folge. Bei den mehr als 1 : 2 verdünnten Proben trat innerhalb von 1 Std. in keinem Falle restlose Abtötung ein. — Eine Reihe von ätherischen Ölen — geprüft in demselben proportionalen Verhältnis, in dem sie in „Kölnisch-Wasser" enthalten sein dürften — lieferten ebenfalls in vitro eine sehr starke bakterizide Wirksamkeit.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Gundel, M. und Blattner, V., Über die Wirkung des Honigs auf Bakterien und infizierte Wunden. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 112. 1934. S. 319—332.)

Der Honig ist als relativ vielseitiges Wundbehandlungsmittel aufzufassen, er beeinflußt vorteilhaft die Heilung und läßt nur eine geringe Vermehrung der Keime in der Wunde zu. Die Wirkung ist aber nicht etwa, wie vielfach angenommen, durch die Bakterizidie der Ameisensäure bedingt; denn vielfach fehlt diese vollständig im Honig. Mit Bestimmtheit sind dagegen Apfelsäure und Milchsäure nachgewiesen worden. Auch Fermente können von Bedeutung sein (Invertase, Diastase, ferner Katalasen, Oxydasen, Peroxydasen und proteolytische Fermente). Es ist möglich, daß die Fermenteinflüsse die offenbar bakterizide Wirkung des hohen Zuckergehaltes (60—80%) unterstützen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Dinger, J. E., Virulenzerhaltung von Pneumokokken in vitro. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 131. 1934. S. 434—447.)

Pneumokokken, die in einem flüssigen (nicht autoklavierten), mit erstarrtem Agar unterschichteten Nährboden gezüchtet wurden, blieben bei einer Temperatur von 27° während eines Zeitraumes von mehr als 14 Mon. lebensfähig und voll virulent. Die Virulenz konnte sogar zurückgewonnen werden, wenn sie auf anderen Nährböden verlorengegangen war. Wahrscheinlich beruht die besondere Wirkung des Nährbodens (z. T. wenigstens) auf dem Austausch von Stoffwechselprodukten einerseits und Nährstoffen anderseits zwischen dem durchwachsenen und nicht durchwachsenen Teil des Nährbodens. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Sobernheim, G., Bact. coli — Paratyphusbazillus — Typhusbazillus — Bact. typhi flavum. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 330—336.)

Aus einem seit mehreren Jahren in der Institutssammlung fortgeführten Coli-Stamm wurde zweimal eine Kultur abgespalten, die alle Merkmale des Paratyphus Schottmüller besaß. Bei der Fortführung in Agarpassagen spalteten die beiden Paratyphus-Stämme einen zur Gruppe des Bact. typhi flavum gehörigen Gelbstamm ab. Einer dieser Stämme zeigte später wieder einen Rückschlag zum Paratyphusbazillus. — Die Verimpfung einer kurz zuvor aus Leichenmaterial gewonnenen Typhuskultur auf eine lebende Pflanze (Kapuzinerkresse) hatte zur Folge, daß der aus der Pflanze wieder herausgezüchtete Stamm in der Agarpassage (am 9. Tag) einen Gelbkeim abspaltete. Diese Abspaltung wiederholte sich nach 76 Passagen noch einmal. Bei dem gehäuften Vorkommen der Gelbkeime gerade auf Pflanzen sind diese Versuche wenig überzeugend.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Frank, Gibt es nur einen Prodigiosus? (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 78—81.)

Im Wasser der früheren Wiesbadener Wasserversorgung hat Verf. während mehr als 20 Jahren häufiger Bact. prodigiosum gefunden. Da er auch in benachbarten Bächen festgestellt wurde, muß der Prodigiosus ständig, offenbar schon seit langer Zeit in dieser Gegend vorkommen. Niemals aber wurde dort das Blutwunder beobachtet. Dies gab Anlaß, die Farbstoffbildung von Bact. prodigiosum näher zu untersuchen,

was an 11 Stämmen verschiedener Herkunft erfolgte. Es ergab sich, daß außer der Form der Kolonien die Farbstoffbildung sehr variabel war. Konstant dagegen blieb die Form der Bakterien auf allen Nährböden, bis ein besonderes Verfahren (langdauernde Züchtung in hoher Bouillonschicht) angewandt wurde. Auf Grund des mikroskopischen Bildes konnten 3 Typen unterschieden werden: 1. Stämme mit kokkoiden und ovalen Formen, 2. Stämme mit länglichen Formen, 3. Stämme mit pleomorphen Formen (Stäbchen, längere Fäden, kokkoide und ovale Formen

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Janik, F., Über nichtsäurefeste Gebilde in Tuberkelbazillenreinkulturen. (Beitrag zur Kritik der zyanophilen Substanz.) (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 131. 1934. S. 462—468.)

In Tuberkelbazillenkolonien fanden sich säurefeste Stäbchen und nicht säurefeste Gebilde in einem offenbar vom Alter der Kultur abhängigen Verhältnis. Die säurefesten Stäbchen traten besonders zahlreich auf bei Berührung mit dem Nährboden und in den äußeren Schichten der aufgefalteten Arkaden der Kultur. Die Säurefestigkeit hängt also ab von der Zufuhr an Nährsubstanzen bzw. Sauerstoff. Die nicht säurefesten Gebilde zeigten eine gewisse Polymorphie. Neben Stäbchen kamen Kokken- und Diplokokkenformen zur Beobachtung. Eine fibrilläre, gerüstartige Struktur der nicht säurefesten Elemente (zyanophile Substanz nach Bezançon und Philibert) war nicht feststellbar. Auch die angeblich von diesen Autoren beobachteten „freien" Granula waren nicht nachweisbar. Die Verteilung der Granula entsprach stets der der säurefesten Stäbchen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Verona, O., Conspectus schizomycetum agri pisani. (Mem. Lab. patol. e batteriol. R. Istit. sup. Agr., Pisa. Vol. 3. No. 61. 1932. 18 p.)

Eine systematisch angeordnete Liste von 52 Schizomyzeten aus der Umgebung von Pisa mit Angaben der Literatur und über das Vorkommen.

Morstatt (Berlin-Dahlem).

Zimmermann, E., Weitere Beobachtungen über die Hämolysine der Vibrionen. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exp. Therapie. Bd. 82. 1934. S. 495—505.)

Soll ein Vibrio in bezug auf seine hämolysierenden Fähigkeiten charakterisiert werden, so ist es erforderlich, anzugeben, gegen welche Blutarten seine Hämolysine gerichtet sind. Denn diese sind nach Absättigungsversuchen offenbar verschieden voneinander und spezifisch gegen bestimmte Blutarten gerichtet. Das Hämolysinbildungsvermögen war künstlich (durch Bakteriophageneinfluß und durch Tierpassagen) nicht modifizierbar; nur spontan konnten sehr geringe quantitative Schwankungen der Erscheinung beobachtet werden. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Freudenberg, K., Beiträge zur Chemie der Stärke und anderer Polysaccharide. (Ztschr. f. angew. Chemie. Bd. 47. 1934. S. 675—677.)

Zu Beginn des Jahrhunderts machte Schardinger die Entdeckung, daß beim Abbau der Stärke mit dem von ihm gefundenen Bacillus macerans kristallisierte Dextrine entstehen, die mit Jod grünblaue bis braune Färbungen gaben. Das am leichtesten lösliche hat er α-, ein schwerer

lösliches β-Dextrin genannt. Einer in geringer Menge auftretenden, wohl noch schwerer löslichen Fraktion legte er die Bezeichnung „Schlamm" bei. Diese Substanzen fanden damals in der Polysaccharidchemie großes Interesse, da man in ihnen Depolymerisationsprodukte und niedermolekulare Grundformen der Stärke zu erkennen glaubte. Da inzwischen in der Polysaccharidchemie die Vorstellung von langen Ketten zur Anerkennung gekommen ist, war es an der Zeit, die Schardingerschen Dextrine neu zu untersuchen.

Nach dem Ergebnis dieser Untersuchungen ist das α-Dextrin ein Gemisch von Kettenmolekülen mit 4 und 5 Glukoseeinheiten. Das β-Dextrin ist gleichfalls ein Gemisch und zwar von etwas höheren Oligosacchariden. Das β-Dextrin macht den Eindruck größerer Einheitlichkeit, an ihm wurde deshalb dis Kinetik des Abbaues studiert. Die kristallisierten Dextrine Schardingers wurden dabei als Bruchstücke mittlerer Kettenlänge erkannt. Die Mehrzahl der Bindungen sind Maltosebindungen, fraglich ist noch, ob die Endgruppe während der Einwirkung des Bacillus macerans gebildet oder ob sie bereits in der Stärke vorgebildet ist und ob der Kettenabschluß anhydridisch ist oder nicht. Die Beantwortung dieser Frage scheint jedoch weniger wichtig zu sein gegenüber der Feststellung, daß der Abschluß der Ketten für die verschiedenen Bestandteile der Stärke von Bedeutung ist und der gelungenen Einordnung dieser Abbauprodukte in das gesamte Problem der Stärke und die gewonnenen Ausblicke auf dieses Polysaccharid selbst. Heuß (Berlin).

Hartelius, V., The Growth of Yeast in Synthetic Media and the Factors produced by Yeast which limit this Growth. (Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg. Vol. 20. 1934. No. 7.)

Verf. untersuchte die Faktoren, die das Wachstum von Hefe in synthetischen Nährlösungen wesentlich beeinflussen, und zwar 1. den Einfluß der Nährstoffe Zucker und Stickstoff, als begrenzende Faktoren; 2. den Einfluß der Stoffwechselprodukte auf Wachstum und Gärung bei Nährstoffüberschuß; 3. die Wirkung von Säure und Alkohol auf Wachstum und Gärung frischer Hefe. Für seine Versuche gebrauchte er Reinkulturen von Saccharomyces cerevisiae, die auf synthetischen Nährlösungen mit 5% Bierwürze gezüchtet wurden. Verf. stellte folgendes fest: 1. Waren Stickstoff und die übrigen Nährsalze im Überschuß vorhanden, so begrenzte lediglich Glukose das Wachstum. Bei Mangel trat Autolyse ein (nach 7 Tagen bei 5% zugegebener Glukose). Der Glukoseverbrauch war eine lineare Funktion der Zeit. Der ph-Wert erreichte das Minimum bei 2,41, bei einer Alkoholkonzentration von 4%. Die Trockensubstanz nahm hiernach stetig ab. Der N-Gehalt der Hefe erreichte ein Maximum, hielt sich danach auf einem tieferen Wert konstant, um nach 37 Tagen weiter abzunehmen. 2. Bei N-Mangel entzog die Hefe dem Nährmedium den gesamten Stickstoff, wobei ihr N-Gehalt sank. Bei 2,5% hörte das Wachstum auf, die Trockensubstanz blieb konstant. Unter diesem Wert ist wahrscheinlich kein Wachstum mehr möglich. 3. Bei Nährstoffüberschuß sank der ph-Wert mit vorangehendem Wachstum auf 2,15, Gärung und Wachstum hörten auf. Erst bei Heraufgehen auf 4 setzten beide wieder ein. 4. Wurde der ph-Wert durch Einbringen von Na_2CO_3 mit der Glukose auf 3—4 gehalten, so endete das Wachstum bei 8—9% Alkohol, die Gärung erst bei 12,6%. Nach Entfernung des Alkohols

begannen beide wieder ihre Tätigkeit. 5. Wurden Alkohol und Säure während der Wachstumsperiode nicht entfernt, so hörte die Vermehrung bei ph = 2,30 und einem Alkoholgehalt von 5—6% auf, die Gärung erst bei 7,3% Alkohol. Der Glukoseverbrauch betrug 14%. 6. Bei ausgeglichenem ph und Entfernung des Alkohols wurde stetiges Gedeihen der Hefe beobachtet. 7. Wurde frische Hefe bei stetig fallendem ph eingesät, so waren Wachstum und Gärung bei ph = 1,8 soeben noch vorhanden, unterhalb 2,5 jedoch verminderte es sich beträchtlich. Bei gleichem Versuch mit steigendem Alkoholgehalt wuchs die Hefe noch in Lösungen mit 10%, die Gärung arbeitete noch bei 12%. In noch höheren Alkoholkonzentrationen trat Autolyse ein. Skallau (Berlin).

Colson, B., The Cytology and Morphology of Neurospora tetrasperma Dodge. (Annals of Botany. Vol. 48. 1934. No. 189. p. 211—224.)

Verf. nahm seine Untersuchungen an 2 Stämmen, A und B, von Dodge vor, die er auf Maisagar züchtete. A und B zeigten, jede Kultur für sich wachsend, Heterothallie. Wenn beide Stämme jedoch zusammenwuchsen, lieferten sie wieder homothallische Abkömmlinge. Ihre Sporen, anfänglich zweikernig, brachten homothallische Myzelien hervor. Die Archikarpe in den Kulturen A, B, A + B sahen gleich aus, eng gewundene Hyphen, mehrkernig und mit dicht gekörntem Zytoplasma angefüllt, im Jugendstadium oft nur mit einer Querwand versehen. Antheridien beobachtete Verf. in keiner seiner zahlreichen Kulturen. Die Archikarpe traten, bei gleicher Behandlung, in den drei Kulturen gleichzeitig auf und wurden bald in Scheiden eingehüllt. Nach der Scheidenbildung stockte das Wachstum bei den Stämmen A und B. Die Primordien wurden zu Sklerotien oder Bulbillen, die für sich wieder wachstumsfähig waren und dabei die elterlichen Eigenschaften aufwiesen. Die Zellen vom Myzel sowohl wie die der Archikarpe, waren während ihrer ganzen Entwicklung mehrkernig. Wuchsen die beiden Stämme im Sklerotienstadium zusammen, so bildeten die Primordien Perithezien. Eine Kernverschmelzung wurde im Frühstadium nicht beobachtet. Bis zur Entwicklung der Asci blieben die Hyphen mehrkernig. Die Asci waren kurz, hakenartig gekrümmt, 2 kernig. Die beiden Kerne teilten sich gleichzeitig unter Bildung von 4 Tochterkernen, von denen die beiden mittleren, an der Krümmung liegend, miteinander verschmolzen. Diese Kernverschmelzung war die einzige, die Verf. in der Entwicklung des Pilzes beobachtete. Der endgültige Kern ist diploid, er besitzt 6 Chromosomen. Verf. stellte 3 Teilungen fest, Reduktionsteilung, Äquationsteilung und mitotische Teilung. In der Haploidphase beträgt die Zahl der Chromosomen 6. Zu Beginn der Sporenbildung waren 8 Kerne vorhanden, wie bei den meisten Askomyzeten. Nach einer paarweisen Gruppierung der Kerne trat eigentliche Sporenbildung ein, anschließend folgte eine erneute Kernteilung, so daß jede Spore im Normalfall bei der Reife 4 Kerne besaß. Zuweilen fand Verf., daß 1 oder mehr als 2 Kerne in die neuzubildende Spore eingingen, jedoch fand anschließend stets eine Kernteilung statt. Nachdem die reifen Sporen etwa 20 Min. auf 70—90° erhitzt waren, keimten sie. Das sich entwickelnde Myzel hatte sehr lange, vielkernige Zellen, später traten hier eigentümliche kragenartige Verdickungen auf. Myzelverschmelzungen wurden in allen Kulturen beobachtet. Aus dem Verhalten des Kerns bei der ganzen Entwicklung des Pilzes glaubt Verf. im Vergleich mit den

übrigen Askomyzeten schließen zu dürfen, daß es sich bei Neurospora tetrasperma um die letzten Stadien einer verschwindenden Syngamie handelt. Skallau (Berlin).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Olsen, H. C., and Hammer, B. W., Numbers of microorganisms falling from the air in dairy plants. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 17. 1934. p. 613—623.)

Unter entsprechenden Vorsichtsmaßregeln wurden während eines Jahres allwöchentlich einmal Petri-Schalen jeweils 1 Std. am Vormittag (10.30 bis 11.30 Uhr) in mehreren milchwirtschaftlichen Betriebsräumen sowie auch im Freien der Luft ausgesetzt. Die Ergebnisse wurden ausgedrückt in der Zahl der Kolonien, die sich auf Grund 1 stündiger Exposition auf einer Petri-Schale von 9 cm Durchmesser nach 4 tägiger Bebrütung bei 21° C gebildet hatten. Es zeigte sich die durchschnittliche Zahl der herabfallenden Keime ziemlich konstant; mengenmäßig nahmen die Bakterien die erste, die Hefen die letzte Stelle ein, während sich die Schimmelpilze in der Mitte hielten. Auch bestand wenig Unterschied zwischen den Innenräumen und der Außenluft; nur die Maximumzahlen wiesen wesentliche Unterschiede zwischen den im Freien und in den Innenräumen exponierten Platten auf, indem besonders die Bakterien sehr hohe Werte erreichten. Bezüglich der Jahreszeiten waren bei den verschiedenen Organismengruppen keine besonderen Schwankungen zu beobachten.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Devereux, E. D., and Mallmann, W. L., Studies of the technic to evaluate the efficiency of several chlorine sterilizers for dairy use. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 17. 1934. p. 351—360.)

Wenn im Augenblick der Probeentnahme nicht sofort auch die Nachwirkung des vorhandenen restlichen Chlors ausgeschaltet wird, werden falsche (zu günstige) Resultate erhalten. Infolgedessen gibt man vorher in das für die Aufnahme des chlorhaltigen Schwenkwassers bestimmte Probeglas 0,1 g Natriumthiosulfat (kristallinisch) und sterilisiert im Trockenschrank bei 200° C. Die unter diesen Vorsichtsmaßregeln durchgeführten Versuche zeigten, daß Hypochloritlösungen mit einem Restgehalt freien Chlors von 6 Teilen pro Million eine für Molkereiapparate genügende Desinfektionswirkung besitzen, während Chloramin T eine längere Einwirkungszeit erfordert. Jedenfalls dürfte es sich allgemein empfehlen, lieber eine schwächer konzentrierte Desinfektionslösung längere Zeit als eine stärker konzentrierte kürzere Zeit einwirken zu lassen, damit ein gewisser Sicherheitsfaktor eingeschaltet bleibt.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Trautwein, K., Die Sake-Bereitung in Japan. (Tageszt g. f. Brauerei. Bd. 32. 1934. S. 249—251.)

Sake ist ein alkoholisches Getränk von bier- bis weinähnlichem Charakter, das aus Reis bereitet wird. Der Arbeitsvorgang zerfällt in vier Abschnitte: 1. Bereitung von Koji, 2. Bereitung von Moto, 3. Bereitung der Moromimaische und Gärung, 4. Pressen und Klären.

Bei der Bereitung von Koji, welches das verzuckernde Agens darstellt, wird enthülster, geweichter und gedämpfter Reis mit Tanesamen, d. s. die

Sporen von Aspergillus oryzae, versetzt und mehrmals durchgearbeitet, bis die Reiskörner vollständig von dem weißen Myzel des Pilzes überzogen sind und die ganze Masse verfilzt ist. Bei der Bereitung von Moto wird aus gedämpftem Reis unter Zusatz von Wasser und Moto eine Maische hergestellt und zur Gärung gebracht, die durch Hefe und andere Gärpilze durchgeführt wird und annähernd 3 Wochen lang dauert. Die Herstellung von Moto erfolgt gleichzeitig mit der von Koji. Die Moromimaische wird dadurch erzeugt, daß man gedämpften Reis mit Koji und Moto zusammenbringt. Die Diastase des Schimmelpilzes im Koji verwandelt die Stärke des Reises in Zucker, der sofort von der Hefe des Moto alkoholisch vergoren wird, ein kleiner Teil des Zuckers wird in Milchsäure übergeführt. Verzuckerung und alkoholische Gärung gehen mit gleicher Intensität vor sich, der Gärprozeß dauert in der Regel etwa 17 Tage. Die Maische wird darauf ausgepreßt, die Flüssigkeit wird teils frisch genossen, teils läßt man sie in den Klärbottichen noch eine Nachgärung durchmachen. Die Preßrückstände, Kasu genannt, werden auf Alkohol verarbeitet, was zuletzt übrig bleibt, dient als Dünger. Droht der Sake in der heißen Jahreszeit umzuschlagen, so wird er durch mäßiges Erhitzen „pasteurisiert". Die Japaner haben also Jahrhunderte vor Pasteur das Verfahren erfunden, verderbende Flüssigkeiten durch mäßiges Erhitzen zu konservieren.

Heuß (Berlin).

Lindner, P., Sawîq, das „feste Bier" der alten Babylonier und Araber. (Tagesztg. f. Brauerei. Bd. 32. 1934. S. 619.)

Bei den Babyloniern wurde schon im Jahre 4000 v. Chr. ein „festes Bier" hergestellt, das als Reisebier in der Wüste besondere Bedeutung hatte. Wo man Wasser fand, brauchte man nur Wasser in den Schlauch zu füllen und Sawîq zuzugeben, um in kurzer Zeit ein erfrischendes Jungbier zu erhalten. Die Gärung wurde zweifellos durch Termobacterium mobile bewirkt, das sich entweder im Innern des gerösteten Gersten-Malzbrotes — das die feste Masse darstellte — oder an den Schlauchwandungen bzw. in den Gefäßen befand und überall verbreitet war und ist, wo es Palmen gibt. Wenn Malzmehl nach dem Einteigen kurze Zeit auf 50—55° C erwärmt und der Verzuckerung überlassen wird, bringt eine Impfung mit T. m. schon nach kurzer Zeit eine Gärung hervor. Es ist damit vielleicht das Geheimnis der uralten Brotbereitung entschleiert, wie sie in den Tropen nur durch die Gegenwart des T. m. möglich war. Das T. m. wurde vom Verf. in einem alten Rest peruanischen Chichabieres nachgewiesen und dürfte auch bei indianischen Bieren eine ausschlaggebende Rolle spielen, da eine Hefegärung nicht so schnell in Gang zu bringen ist.

Heuß (Berlin).

Naumann, H., Aus der Hochschulbrauerei. (Tagesztg. f. Brauerei. Bd. 32. 1934. S. 693.)

Die biologische Säuerung mit Hilfe des Bacillus Delbrücki bewirkt eine vorteilhafte Verschiebung des ph, eine Verbesserung des Biergeschmacks und eine Veredlung des Bieres. Biospäne verbessern den Vergärungsgrad im Gärkeller bei schleppender Vergärung, auch mit Aluminiumblattspänen wurden im Lagerkeller in bezug auf Verbesserung der Nachgärung und Klärung des Bieres gute Erfahrungen gemacht. Der Plattenerhitzer und -kühler Astra hat sich als Bierpasteurisierungsapparat ohne Schädigung des Kohlensäuregehaltes und der Schaumhaltigkeit bewährt.

Heuß (Berlin).

Janensch, Fr., Biologische Mitteilungen. Über biologische Luftuntersuchungen im Zusammenhang mit Luftentkeimungsanlagen. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 51. 1934. S. 165—167.)

Durch Luftentkeimungsanlagen kann man in der Brauerei die Kühlschiffwürze einschließlich des Trubs steril erhalten und die Würze auch praktisch steril zum Anstellen in den Gärkeller bringen, wie in vielen Fällen durch biologische Kontrolle des Würzewegs unter Anwendung der Tropfenkultur nach Lindner, der Weinsäurekultur und der Hefeextraktkultur nach Stockhausen bewiesen werden konnte. Bei den Entkeimungsanlagen wird im allgemeinen eine Leistung des Filters von 98—99% garantiert, zur Kontrolle bedarf es einer Methode, welche die genaue Ermittlung des absoluten Keimgehaltes der genommenen Luftproben gestattet. Verf.n setzt Hefewasser-Agar-Petrischalen einmal dem Strom der Rohluft und darauf dem Strom der filtrierten Luft aus und beobachtet sie mindestens 6 Tage lang bei Zimmertemperatur auf Wachstum von Organismen. Der Hefewasser-Agarnährboden ist besonders günstig für das Wachstum bierschädlicher Hefen- und Bakterienarten, sowie die übrige Mikrobenflora. Die sonst viel verwendete Würzegelatine ist weniger geeignet, weil sie keinen so günstigen Nährboden zum Nachweis von Milchsäurestäbchen und Sarzinen darstellt und außerdem durch bestimmte Organismen leicht verflüssigt wird. Um Vergleiche anstellen zu können, muß die Luftmenge, die auf die Platte bei der Exposition geströmt ist, ermittelt werden. Man mißt dazu die Geschwindigkeit des Luftstromes an der Entnahmestelle während der Dauer einer Minute mit Hilfe eines Anemometers und rechnet die Keimzahl auf 1 cbm Luft um.

Die Berechnung der Keimzahl wird an einem praktischen Beispiel dargestellt. Die Petrischale hatte einen Durchmesser von 9,5 cm, nach der Formel $r^2 \cdot \pi$ also eine Grundfläche von 71 qcm, die Luftgeschwindigkeit betrug 435 m in der Minute. Bei einer Expositionszeit von 3,5 Min. wirkte also eine Luftmenge von $3{,}5 \times 435 \times 0{,}0071 = 10{,}81$ cbm auf die Petrischale ein. Auf ihr entwickelten sich 611 Keime, so daß auf 1 cbm Luft $611 : 10{,}81 = 56{,}52$, also rund 57 Keime entfielen. Nach Filtration dieser Luft fand man pro cbm nur noch 0,23 Keime, die Verringerung des Keimgehalts durch die Wirkung des Filters betrug in diesem Falle also

$$\frac{(57 - 0{,}23) \times 100}{57} = 99{,}60\%.$$

Derartige Resultate wurden bei der Prüfung von Luftentkeimungsanlagen häufig gefunden, wesentlich für die Wirkung ist natürlich, daß die entkeimte Luft nicht nachträglich neuerdings infiziert wird. Heuß (Berlin).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Peeger, Untersuchung von württembergischen Hopfen der Ernte 1933 auf Arsengehalt. (Allg. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 74. 1934. S. 369.)

Es sollte festgestellt werden, ob der Hopfen von Natur aus Arsen enthält und welchen Einfluß das Spritzen mit Kupfermitteln sowie das Schwefeln auf den Arsengehalt ausübt. Zu diesem Zweck wurden 6 Hopfenproben aus den Anbaugebieten Tettnang bzw. Rottenburg-Herrenberg-Weilderstadt untersucht. Man stellte bei ungespritzten Proben 0,5 mg Arsen je kg, bei

gespritzten Proben 0—0,8 mg Arsen je kg, bei gespritzten und geschwefelten Proben 0,95 mg Arsen je kg fest. Spritzen und Schwefeln beeinträchtigt also die Verwertung des Hopfens in gesundheitlicher Hinsicht in keiner Weise. Heuß (Berlin).

Hampp, H., Kosten der Bekämpfung der Hopfenkrankheiten. (Allg. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 74. 1934. S. 461—462.)

Eine allgemein gültige Kostenberechnung läßt sich nicht aufstellen, weil die Kosten für die Bekämpfung der einzelnen Krankheiten des Hopfens in den verschiedenen Anbaugebieten und dort wieder in den einzelnen Lagen und Betrieben sehr verschieden sind. Verf. gibt auf Grund eigener Erfahrungen Richtlinien und Kostenberechnungen für die Bekämpfung der Peronospora durch Spritzen mit Kupferkalk Wacker, der Blattläuse durch Spritzen mit Schmierseifen-Tabakextraktlösung, der Roten Spinne durch Spritzen mit Schwefelkalkbrühe, der Erdflöhe durch Bestäuben mit „Polvo". Heuß (Berlin).

Simmonds, P. M., and Sallans, B. J., Further studies on amputations of wheat roots in relation to diseases of the root system. (Scientific Agriculture. Vol. 13. 1933. p. 439—448.)

Verff. haben die Keimwurzeln und Kronenwurzeln von Pflanzen der Weizensorte Marquis Ottawa 15 in verschiedenen Entwicklungsstadien entfernt und die Wirkung dieser Maßnahme auf die weitere Entwicklung untersucht. Es zeigte sich, daß eine Entfernung der Keimwurzeln am 9. Juni (39 Tage nach der Aussaat) den Ertrag um 64% verminderte, der Kronenwurzeln am 20. Juni dagegen nur um 12,9%. Ähnliche Wirkungen zeigten sich in der Durchschnittshalmzahl je Pflanze und anderen Merkmalen. Die Reife wurde verzögert bzw. beschleunigt. Demnach ist die Pflanze in der ersten Vegetationshälfte vor allem auf die Versorgung durch die Keimwurzeln angewiesen. Späterhin kehrt sich das Verhältnis um. Am 23. 6., 7. 7., 21. 7. vorgenommene Entfernungen der Keimwurzeln riefen Ertragsminderungen um 41,2 bzw. 10,3 bzw. 0% hervor, während nach Entfernung der Kronenwurzeln am 4. 7., 18. 7., 1. 8. solche von 22,3 bzw. 35,2 bzw. 22,2% eintraten. Durch wiederholte Entfernung der Kronenwurzeln konnte gezeigt werden, daß deren Funktion weitgehend von den Keimwurzeln übernommen werden kann. Aus den Beobachtungen erhellt die Bedeutung der Erkrankungen des Wurzelsystems, die im Hinblick auf den Befall der oberirdischen Teile durch manche Parasiten erörtert wird.

Braun (Berlin-Dahlem).

Mead, H. W., Studies of methods for the isolation of fungi wheat roots and kernels. (Scientific Agriculture. Vol. 13. 1933. p. 304—312.)

Verf. hat Samen bzw. Wurzeln von Weizen verschiedenen Behandlungen unterworfen. Diese bestanden in 1½—20 Min. Eintauchen in wässeriger oder alkoholischer Saponinlösung, wässeriger alkoholischer oder Sublimatlösung, Silbernitrat, Kalziumhypochlorit, Wasserstoffperoxyd sowie im Waschen in sterilem Wasser nach Vorbehandlung mit Saponin oder Alkohol zur Erhöhung der Benetzungsfähigkeit. Außerdem wurde trockene Hitze und Heißwasserbehandlung angewandt. Silbernitrat und Sublimat ergaben eine sehr wirksame Desinfektion der Samen und Wurzeln. Die anderen

Behandlungen hatten dagegen sehr üppige Entwicklung der in den Samen und Wurzeln vorkommenden Pilzflora zur Folge, eignen sich also für die Isolierung der Parasiten von diesen. Braun (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Richter, H., Eine noch nicht aufgeklärte Lupinenkrankheit. (Nachrichtenbl. f. d. D. P. D. 14. Jahrg. 1934. S. 82—83, 4 Abb.)

Verf. berichtet über eine Lupinenkrankheit, die bei flüchtiger Betrachtung der Fusarium-Welke ähnelt. Die Krankheit richtete bei starkem Befall in kurzer Zeit ganze Bestände zugrunde. Die Krankheit wird zuerst als oberflächliche, braune, streifige Verfärbung am Stengel sichtbar. Bald folgt bei jüngeren Pflanzen eine Verkrümmung des oberen Sproßteils. Häufig ist die Sproßspitze hakenförmig nach unten gebogen. Bei älteren Pflanzen sind die Verkrummungen meist schwächer. Bald folgt ein Verwelken und Nachuntenknicken der Blätter. Gelegentlich treten als Anfangssymptome dunkel- bis schwarzbraun gefärbte Flecke an der Sproßbasis auf. Bei Erkrankung nach der Blüte knicken die jungen Hülsen bald nach unten, werden braun und vertrocknen. Bei späterem Befall zeigen sich auf den Hülsen braune, meist eingesunkene Flecke. Bei den bisherigen Untersuchungen haben sich pathogene Mikroorganismen nicht isolieren lassen. Die Frage der Übertragbarkeit ist noch nicht geklärt. Die Krankheit kommt an Lupinus angustifolius, luteus und albus, sowohl an bitteren wie auch an alkaloidfreien vor. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Broadfoot, W. C., and Robertson, H. T., Pseudo-black chaff of Reward wheat. (Scient. Agriculture. Vol. 13. 1933. p. 512—514.)

Verff. haben an den Spelzen von Reward-Weizen Verfärbungen beobachtet, die an die durch Bacterium translucens undulosum verursachten erinnern. Kulturversuche wie histologische Untersuchungen ergaben aber, daß es sich hier nicht um parasitäre Schädigungen handelt. Vielmehr ist die Verfärbung offenbar auf Erbfaktoren zurückzuführen, die nur in bestimmten Stämmen der Sorte zur Auswirkung gelangen, wobei die Umweltfaktoren, insbesondere das Licht, eine maßgebliche Rolle spielen. Braun (Berlin-Dahlem).

Hurst, R. R., Observations on the brown heart disease of turnips. (Scientific Agriculture. Vol. 14. 1934. 679—686.)

Die Braunherzigkeit von Brassica rapa rapifera ist eine physiologische Erkrankung, die in Prince Edward Island alljährlich einen Verlust von 5000 Doll. verursacht. Die Symptome der Krankheit werden beschrieben. Für das Vorliegen einer Virusinfektion liegen bisher trotz entsprechender Versuche keinerlei Anzeichen vor. Die Verbreitung der Krankheit ist kartographisch dargestellt. 1932 sind vier anscheinend resistente Sorten gefunden worden. Beziehungen zwischen dem Auftreten der Krankheit einerseits, der Saatzeit anderseits konnten nicht festgestellt werden. Stalldunggaben drängen das Auftreten der Krankheit stark zurück; auf den Stellen, wo im Vorjahr Dunghaufen gelegen hatten, wurde überhaupt keine Braunherzigkeit beobachtet. Braun (Berlin-Dahlem).

Schulz, K. G., Die „Kornrissigkeit", eine neue Beschädigung an Gerste. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 61. 1934. S. 130, 1 Abb.)

Verf. beschreibt eine als „Kornrissigkeit" bezeichnete Erscheinung an Gerste, die sich entweder darin äußert, daß die Körner in der Bauchfurche oder seitlich verschieden stark aufplatzen. Die an „Kornrissigkeit" erkrankte Gerste ist für Braugerste nicht geeignet. Tierische oder pflanzliche Erreger kommen nicht in Frage. Verf. vermutet, daß es sich beim Aufreißen in der Bauchfurche um ein mechanisches Zerreißen des Korngefüges handelt, das auf Spannungsunterschiede zurückzuführen ist, die bei der Ausreifung der verschiedenen Schichten des Gerstenkornes herrschen. Bei dem seitlichen Platzen ist nach Ansicht des Verf.s anzunehmen, daß bei günstiger Witterung eine reichliche Nährstoffzufuhr zu einer zu starken Kornausbildung geführt hat. Da die Spelzen nicht so ausdehnungsfähig sind, haben sie dann das Korn nicht mehr ganz umhüllen können. Verf. rät von Verwendung von Gerste, die Kornrissigkeit zeigt, als Saatgut ab.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Perotti, R., Per la lotta contro la „stretta" dei cereali. [Zur Bekämpfung der Notreife des Getreides.] (Mem. Lab. patol. e batteriol. R. Istit. sup. Agr., Pisa. Vol. 2, Nr. 49. 1931. 4 p., 1 Taf.)

Die in verschiedenen früheren Arbeiten (Mem. 9, 23, 35, 40, 43) dargestellte wasserbindende Wirkung fein gepulverter Kohle als Zusatz zu Düngemitteln zeigt sich auch in der Verhütung oder Verminderung von Trockenheitsschäden zur Reifezeit der Getreidekörner. Dahingehende Versuche mit Weizen und Mais werden geschildert; günstige Resultate ergaben sich auch bei Tabak und Kartoffeln. Morstatt (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Melchers, L. E., Investigations on physiologic specialization of Tilletia laevis in Kansas. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1203—1226, 2 figs.)

Verf. weist zunächst darauf hin, daß der Steinbrand in den letzten 8 Jahren wesentlich an Verbreitung zugenommen hat. Er läßt die Frage offen, ob der Anbau anfälligerer Sorten wie Blackhull und Kanred oder Variationen beim Erreger die Ursache sind. Alle untersuchten Proben waren T. laevis. Die Virulenz wurde an den Sorten Turkey (C. I. 1558 A), Martin, Hussar, White Odessa, Oro, Ridit und Banner Berkeley ermittelt. Es wurden 7 physiologische Formen festgestellt. Die Sorten Turkey × Bearded und Yogo zeigten Resistenz gegen alle untersuchten Steinbrandherkünfte aus Kansas. Die Sorten Martin, Ridit, Hussar, White Odessa, Banner Berkeley, Regal, Oro und Kooperatorka erwiesen sich als ziemlich resistent gegen die meisten Herkünfte aus Kansas. Es ist aber bekannt, daß diese anfällig gegen bestimmte Formen in anderen Teilen der Vereinigten Staaten sind. Die Form 1 von Tilletia laevis ist in Kansas an meisten verbreitet. Auf Bodenextrakt- und Weizenkörnerextrakt-Agar keimten die Sporen von Tilletia laevis gut. Die besten Kulturmedien zur Feststellung von Unterschieden bei den physiologischen Formen war Kartoffel-Rohrzucker 4% und Hafermehl-Traubenzucker-Agar 3%. Konstante und bestimmte Unterschiede wurden zwischen 5 physiologischen Formen festgestellt.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Mains, E. B., Inheritance of resistance to powdery mildew, Erysiphe graminis tritici, in wheat. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1257—1261.)

Die Untersuchungen des Verf.s ergaben, daß die Resistenz der Weizensorte Norka im Sämlingsstadium gegen die physiologische Formel von Erisyphe graminis tritici als einfacher dominanter Faktor vererbt wird. Dasselbe ist bei der Sorte Red Fern der Fall. Die Resistenz bei den Sorten Hope und Sonora beruht auf einem einfachen rezessiven Faktor und anscheinend trifft das auch für die Sorte Michigan Amber zu.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Voorhees, R. K., Sclerotial rot of corn caused by Rhizoctonia zeae, n. sp. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1290—1303, 7 figs.)

Verf. beschreibt eine neue Trockenfäule von Maiskolben. Als Erreger wird Rhizoctonia zeae n. sp. beschrieben. Der Erreger ist in der Lage, die Wurzeln und das Mesokotyl bei Mais zum Abfaulen zu bringen, aber die größte Bedeutung hat er als Erreger der Kolbenfäule. Junge Kolben sind anfälliger als ältere. Die Morphologie, die Bildung und Entwicklung der Sklerotien wurden genauer verfolgt. Rhizoctonia zeae wächst gut und bildet Sklerotien auf künstlichen Nährböden, auf sterilen Körnern und auf Maismehl. In Reinkultur auf Kartoffel-Traubenzucker-Agar lag das Temperaturminimum für das Myzelwachstum zwischen 11 und 14° C, das Maximum zwischen 40 und 42° C und das Optimum bei 33° C. Keine Entwicklung war bei ph 2,5 zu beobachten. Das beste Wachstum zeigte sich bei ph 6,8. Der Pilz überwintert als Dauermyzel und als Sklerotien an Samen, an Pflanzenresten und im Boden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Oserkowsky, J., Fungicidal effect on Sclerotium rolfsii of some compounds in aqueous solution and the gaseous state. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 815—819, 1 fig.)

Das Myzel von Sclerotium rolfsii wurde durch gesättigte Dämpfe von Naphthalen bei 29—30° C im Wachstum gehemmt, während die Dämpfe von α-Monochlornaphthalin und α-Monobromnaphthalin bei einigen Kulturen tödlich wirkten. Das Myzel wurde abgetötet durch Dämpfe von Trioxymethylen, Benzol, Toluol, Xylol, Nitrobenzol, Ortho-, Meta- und Paradichlorbenzol. Sklerotien wurden abgetötet, wenn sie 3 Tage bei 25—26° C den gesättigten Dämpfen von Benzol, Toluol, Xylol, Äthylbenzol, Propylbenzol, Chlorbenzol, Ortho- und Metadichlorbenzol, 1, 2, 4, Trichochlorbenzol, Nitrobenzol, Chloroform, Tetrachlorkohlenstoff, Brompikrin, Jod, Schwefelkohlenstoff und Trioxymethylen ausgesetzt wurden. Sklerotien wurden auch abgetötet, wenn sie einen Tag lang in eine 0,33 proz. Lösung von Merthiolate oder eine 0,1 proz. Lösung von Hexylresorzin oder 5 Tage lang in eine 0,1 proz. o-Chlorphenollösung getaucht wurden. Ersatz eines NO_2-Radikals in dem Benzolring äußerte sich in einer größeren Giftigkeit als der Ersatz von NH_2, Brom oder 2 Cl-Atomen in der Parastellung. Ersatz von Cl durch Br erhöhte die Giftigkeit.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Pape, H., Federbuschsporenkrankheit des Weizens. (Dtsch. Landw. Presse. Bd. 61. 1934. S. 255; 1 Taf.)

Auf einer von A. Dressel gemalten Tafel ist die durch Dilosphora

graminis verursachte Federbuschsporenkrankheit in verschiedenen Stadien dargestellt. Im Begleittext ist näheres über Verbreitung, Krankheitsbild, Erreger und Bekämpfung ausgeführt.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Kadow, K. J., Seed transmission of Verticillium wilt of eggplants and tomatoes. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1265—1268, 1 fig.)

Der Verticillium-Welkeerreger bei Tomaten und Eierpflanzen wird mit dem Samen übertragen und zwar sitzt der Erreger im Innern des Samens. Heißwasserbehandlung 20 Min. lang bei etwa 49° C hatte Erfolg. Die Auswahl von gesundem Saatgut ist sehr zu empfehlen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Kendrick, J. B., and Schroeder, F. R., Inoculation tests with Verticillium wilt of muskmelons. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1250—1252.)

Auf einem Felde in Kalifornien trat die Verticillium-Welke an Cucumis melo und zwar bei der Sorte Persian stark auf. Die daneben angebauten Sorten Hale's best und Honey Dew waren nicht befallen. Bei Gewächshausversuchen zeigte sich die Krankheit an den Sorten Casaba, Hale's Best, Honey Ball, Honey Dew und Persian.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Miles, L. E., Treatment of sweet-potato for the control of black rot. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1227—1236.)

Durch Eintauchen in Kupferkalkbrühe 20 : 20 : 50 oder in Kupferkalkstaub wurden Süßkartoffelpflanzen kaum geschädigt, wenn das Auspflanzen bald nach der Behandlung erfolgte. Durch Eintauchen der Stengel und Wurzel in eine Sporensuspension von Ceratostomella fimbriata, dem Erreger der Schwarzfäule, wurde eine starke Infektion erzielt. Wurden die infizierten Pflanzen mit Kupferkalkbrühe oder Kupferkalkstaub behandelt, wurde ein Ausbruch der Krankheit verhindert. Verf. sieht daher in der Behandlung mit Kupferkalkbrühe oder Kupferkalkstaub ein Mittel, um die Verbreitung der Schwarzfäule beim Transport vom Erzeuger zum Käufer zu verhindern. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Nagel, C. M., Conidial production in species of Cercospora in pure culture. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1101—1110, 1 fig.)

Cercospora beticola, C. dubia, C. davisii und C. zebrina zeigten zunächst, wenn Isolationen von den Flecken an der Pflanze gemacht wurden, auf 30 verschiedenen Nährböden keinerlei Konidienbildung. Wurden dagegen die Blätter zunächst in eine feuchte Kammer gelegt, so daß Sporenbildung einsetzte, wurde die Konidienbildung bei der Übertragung auf Nährböden fortgesetzt. Außer bei den genannten Cercospora-Arten wurde die Sporenbildung bei C. althaeina, C. avicularis, C. cruenta, C. muhlenbergiae, C. moricola, C. mirabilis, C. medicaginis, C. physalidis und C. setariae beobachtet. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 23. März 1935.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 92. No. 4/7.
Ausgegeben am 15. Mai 1935.

Nachdruck verboten.

Die wechselseitige Beeinflussung von Pilzen und die Bedeutung der Pilzkonkurrenz für das Ausmaß der Schädigung an Weizen durch Ophiobolus graminis Sacc.

[Aus dem Institut fur Pflanzenkrankheiten der Landwirtschaftlichen Hochschule Bonn.]

Von **Maria Brömmelhues**[1]).

Mit 10 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Am Institut für Pflanzenkrankheiten in Bonn werden seit einigen Jahren Untersuchungen über die „Fußkrankheiten" des Getreides durchgeführt. Unter dem Begriff Fußkrankheit faßt man eine Reihe von Krankheitserscheinungen zusammen, bei denen durch eine Anzahl von Parasiten entweder die Wurzel oder die Halmbasis von Gramineen zerstört wird. Als Erreger einer Wurzelfäule konnte Ophiobolus graminis Sacc. festgestellt werden, während die Zerstörung des Halmes, die ein Lagern des Getreides zur Folge hat, durch Cercosporella herpotrichoides de Not verursacht wird. Aus den vorliegenden Arbeiten über die Fußkrankheiten ergab sich nun, daß mit diesen beiden Hauptparasiten meist noch eine Reihe anderer Pilze vergesellschaftet lebt. Einige Ergebnisse weisen darauf hin, daß die Zusammensetzung der Bodenflora entscheidend oder doch wesentlich für die Lebensmöglichkeit und Angriffsfähigkeit von Ophiobolus graminis Sacc. sein kann. Es ergab sich daher die Notwendigkeit, die Beeinflussung von Ophiobolus graminis Sacc. durch andere Pilze kennenzulernen. Zunächst wurden für diese Versuche naturgemäß diejenigen Pilze ausgewählt, die in erster Linie mit den beiden Hauptparasiten vergesellschaftet gefunden werden. Bei der außerordentlichen Mannigfaltigkeit der Bodenflora können natürlich auch noch andere Mikrobionten, z. B. Bakterien, vielleicht sogar maßgebenden Einfluß haben. Doch erschien es richtiger, die Untersuchungen auf eine kleinere Anzahl von Pilzen zu beschränken und für diese neben ihrer Wirkung im Vegetationsversuch auch ihre wechselseitige Beeinflussung in der Reinkultur zu prüfen, um für die ursächliche Klärung der Wechselwirkung zwischen Ophiobolus graminis Sacc. und anderen Pilzen Anhaltspunkte zu finden.

In der Literatur findet sich eine Reihe von Arbeiten, die die Frage der Pilzkonkurrenz behandeln. Aus diesen geht hervor, daß bestimmte Mikroorganismen erst ihre volle Ausbreitungsmöglichkeit finden, wenn ihnen der

[1]) Erschienen als Dissertation der Philosophischen Fakultat der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universitat in Bonn.

Lebenskampf durch Ausschaltung ihrer Konkurrenten erleichtert wird [Frank (19), Bamberg (4), Henry (25), Porter (46), Sandford (55), Sandford & Broadfoot (56), Vasudeva (66), Moritz (41)], und daß andere Mikroben erst zur Entwicklung kommen können, wenn für diese durch die Anwesenheit eines bestimmten Lebewesens günstige Entwicklungsbedingungen geschaffen werden [Fischer & Gäumann (17), Volk (69)].

Die gleiche wechselseitige Beeinflussung, die die einzelnen Mikroorganismen unter natürlichen Bedingungen zeigen, wurde auch beim Experimentieren mit Reinkulturen festgestellt [Küster (35), Satoh (58), Wehmer (72), Behrens (17), Nikitinsky (45), Taylor (39), Brown (10), Pratt (48), Boas (6), Liesegang (37), Reinhardt (52), Schmidt (61)].

Zur ursächlichen Klärung der Hemmung findet man in der Literatur verschiedene Meinungen vertreten, die keine einheitliche Deutung des Problems zulassen. Nach diesen Angaben kann eine gegenseitige Beeinflussung zweier Myzelien zustande kommen:

1. durch besondere Stoffwechselprodukte (Cayley 12, Müller 43),
2. durch eine Aziditätsänderung, die aber nur in seltenen Fällen zu einer Hemmungsraumbildung führt (Schmidt 61),
3. durch Nährstoffmangel (Schmidt 61, Liesegang 37, Boas 6),
4. durch besondere Enzymausscheidungen, die auf fremde Pilze hemmend wirken (Reinhardt 52),
5. durch Auflösen der Hyphen eines Pilzes durch den anderen (Porter 46, Reinhardt 52).

Von den hier angeführten Literaturangaben ist für unsere spezielle Fragestellung, der Beeinflussung der bei der Fußkrankheit des Getreides auftretenden Pilze untereinander die wichtigste die Arbeit von Broadfoot und Sandford (57).

I. Teil.

Untersuchungen über die wechselseitige Beeinflussung von Pilzen in der künstlichen Kultur.

A. Die wechselseitige Beeinflussung von Pilzen in Agarkulturen.

1. Methodik und Vorversuch.

In der hier vorliegenden Arbeit ist ein Versuch gemacht worden:

1. die Art der Wechselwirkung von Ophiobolus graminis Sacc., Cercosporella herpotrichoides de Not, Fusarium culmorum, Helminthosporium sativum, Cladosporium herbarum Link, Alternaria sp.[1] F_1, Penicillium sp., Mucor sp., Bacillus coli untereinander zu prüfen,
2. diese ursächlich zu klären,
3. die Auswirkung des gegenseitigen Konkurrenzkampfes der Mikroorganismen auf die Pflanze festzustellen.

Die Pilze wurden von kranken Pflanzen isoliert. Es waren durchweg stark infektiöse Stämme, soweit es sich um Parasiten handelte. Mucor sp. und Penicillium sp. stammen aus dem Boden, Bacillus coli

[1]) Es handelt sich wahrscheinlich um Alternaria tenuis Nes.

bezogen wir von „The John McCormick Institute for Infectious Diseases, Chicago". Leider konnte ich die von Sandford und Broadfoot verwandten Stämme nicht erhalten, da sie zum Teil nicht mehr vorhanden waren. Die Ergebnisse meiner Arbeit sind also nicht direkt vergleichbar mit denen der zitierten, da sich die einzelnen biologischen Rassen der Pilze oft verschieden verhalten.

Zu den Plattenkulturen wurde Agar-Agar verwandt. Es erwies sich als notwendig, einen Agar-Nährboden zu wählen, auf dem alle in Frage kommenden Organismen gutes Wachstum zeigten. Relativ gut gedeihen alle auf Biomalzagar. Dieser hat noch den Vorzug, daß er bei sorgfältiger Herstellung glasklar ist. Man kann daher in diesem Nährmedium das Wachstum der Hyphen im Substrat makroskopisch und mikroskopisch gut verfolgen.

Tab. 1. Wachstum der Pilze auf Biomalzagar.

Pilz	Alter der Kultur bei der Messung	Durchmesser „d"	Bemerkungen
Ophiobolus	9 Tage	77,75 ± 0,5012	Anwachsen mit dichtem Substratmyzel: Sporen- und Pigmentbildung fehlen.
Cercosporella	14 Tage	25,50 ± 0,2506	Anwachsen mit Myzelkuppe aus dichten Hyphen, später Bildung eines dichten hellen Hyphensaumes.
Fusarium	5 Tage	67,50 ± 0,1253	Anwachsen mit farblosem Substratmyzel, später Bildung von Luftmyzel und Pigment vom Impfzentrum ausgehend.
Helminthosporium	6 Tage	31,10 ± 0,3000	Anwachsen mit dichtem, weißem Luftmyzel, das in breiter Randzone erhalten bleibt.
Cladosporium	6 Tage	37,15 ± 0,3000	Anwachsen mit farblosem Substratmyzel. Nach 2 Tagen lebhafte Pigment- und Sporenbildung, nur die Randzone bleibt farblos.
Alternaria	6 Tage	63,90 ± 0,2004	Anwachsen mit grau-grünem Substrat- und Luftmyzel. Ausbildung von oliv-grünen Sporenringen.
Penicillium	6 Tage	54,35 ± 0,3257	Anwachsen mit farblosem Substratmyzel. Später Ausbildung konzentrischer grüner Sporenringe.
Mucor	5 Tage	77,15 ± 0,2380	Anwachsen mit farblosem Substratmyzel. Später Bildung von Lufthyphen und Sporangien.

Soweit nicht besonders erwähnt, wurden die Nährböden folgendermaßen hergestellt:

Im Wasserbade werden 20 g Agar-Agar mit 1000 ccm Aqua. dest. aufgelöst, nach Zusatz von 10 g Biomalz[1]) durch ein Tuch filtriert. Von diesem Nährboden werden genau 15 ccm in jede Petrischale (9 cm Durchmesser, 1,5 cm Höhe) abgemessen. Die gefüllten Schalen sterilisiert man ½ Std. lang bei 1,2 Atm. Es ist unbedingt notwendig, daß alle Kulturen, die untereinander verglichen werden sollen, die gleiche Schichtdicke haben, da durch die Dicke, nach den Angaben von Schmidt (61) und auch nach meinen eigenen Erfahrungen, das Wachstum des Pilzes wesentlich beeinflußt werden kann.

Bei dieser Herstellungsweise hat der Agar einen ph-Wert von 6,29—6,3 (gemessen nach der Chinhydron-Methode).

[1]) Aus der Biomalz-Fabrik Patermann, Teltow-Berlin.

Das Impfmaterial stammte stets von einheitlichen Agarkulturen gleichen Alters. Von der peripheren Myzelzone wurden 2 qmm große Agarwürfel ausgestochen. Um gute Vergleichswerte zu bekommen, ist es notwendig, die Agarstücke in gleicher Größe zu wahlen.

Beim Impfen ist zu beachten, daß das Impfstück nicht zerdrückt wird, da sonst das Wachstum der Kultur nicht einheitlich ist. Solche Störungen treten besonders stark bei Helminthosporium auf. Man sieht dann vom Impfstück ausgehend bis zur Peripherie der Pilzkultur radiale Zonen, die beim sorgfältigen Impfen nie zu bemerken sind.

Die Kulturen wurden aufbewahrt in dunklen Thermostaten bei einer konstanten Temperatur von 22,5—23,5° C, einer Temperatur, die allen hier in Frage kommenden Organismen gutes Wachstum ermöglichte.

Durch Aufstellen flacher, mit Wasser gefüllter Schalen war für hohe Luftfeuchtigkeit im Thermostaten gesorgt. Als Maß für das Wachstum der Pilze galt die radiale Myzelausdehnung[1]).

Bestimmt wurden immer zwei Durchmesser; der erste (d_1) wurde willkürlich gewählt, der zweite (d_2) stand senkrecht auf dem ersten. Beide weichen selten mehr als 1—1,5 mm voneinander ab, da bei sorgfältigem Impfen die Kulturen fast vollkommen radial wachsen. Das arithmetische Mittel dieser beiden Werte ergab „d_3". Gearbeitet wurde immer mit 5 Kontrollen, deren Werte (d_3) im Mittel den Durchmesser „d" ergaben. Jede Versuchsreihe wurde wenigstens 3mal wiederholt. Waren die gefundenen Werte in beiden Reihen annähernd gleich, so galten sie als gesichert.

Um das Ausmaß einer gegenseitigen Beeinflussung von Pilzen kennenzulernen, ist es natürlich zuerst erforderlich, die Daten für das Wachstum der einzelnen Pilze unter den gleichen Kulturbedingungen festzulegen. Diese sind mit den Mittelwerten „d" in Tab. 1 zusammengestellt.

2. Wechselseitige Beeinflussung gleicher Pilze.

Nach Festlegung dieser Daten für das Wachstum der Pilze mit einem Impfstück, suchte ich in einer anderen Versuchsreihe festzustellen, wie die hier beschriebenen Pilze sich gegenseitig beeinflussen, wenn sie gegeneinander auf eine Agarplatte geimpft werden.

Da die Stärke der Hemmung abhängig ist von der Entfernung der Impfzentren, wie schon Schmidt (61) in seiner Arbeit angegeben hat, und wie ich aus meinen Versuchen bestätigen kann, wurde stets ein Abstand der Impfstücke von genau 4 cm eingehalten. Zur Kontrolle impfte ich nur einseitig.

Jede Versuchsreihe wurde mit 6 Pilzkulturen durchgeführt und wenigstens 3mal wiederholt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Abweichungen vom normalen Wachstum der Pilze kurz angegeben.

Die Tab. 2 zeigt, daß gleiche Pilze imstande sind, sich gegenseitig in ihrer Entwicklung zu beeinflussen. Immer erfolgt bei den beschriebenen Pilzen nach der Berührung, oft schon in bestimmter Entfernung, eine Sistierung des Wachstums, niemals ein ungehemmtes Überwachsen. Am wenigsten werden Ophiobolus und Cercosporella durch das Nachbarmyzel beeinflußt. Bei diesen Pilzen nimmt in der ersten Berührungszone der Hyphen nur die Myzeldichte ab.

Die übrigen Pilze reagieren mit der Ausbildung eines typischen Hemmungsraumes, der entweder frei oder doch nur von ganz wenigen Pilzhyphen durchzogen ist. Dabei nimmt die Sporenbildung bei solchen Pilzen, die normalerweise stark fruktifizieren, z. B. Cladosporium und Alternaria, in der Nähe der Hemmungszone ab, während umgekehrt unter normalen Be-

[1]) Für Plattenkulturen ist dieses die gebräuchlichste Beurteilungsart. Es sei aber bereits jetzt schon betont, daß der Durchmesser einer Kultur keinen sicheren Anhaltspunkt für die Lebensbedingungen bietet, die der Pilz auf einem Nährboden findet. Später wird auf diese Frage noch näher eingegangen werden.

dingungen nur schwach bzw. ohne Fruchtlager fruktifizierende Pilze wie Fusarium durch die Hemmung zu lebhafter Sporen- und Pigmentbildung angeregt werden.

Tab. 2. Wechselseitige Beeinflussung gleicher Pilze.

Pilze	Dauer des normalen Wachstums	Abweichungen vom normalen Myzelwachstum
Ophiobolus gegen Ophiobol.	7 Tage bis zur Berührung der beid. Myzelien	Einstellen des Wachstums der sich berührenden Hyphen und Ablenkung; nur die seitlichen wachsen noch nach und bilden hier eine dichte, 2 mm breite, weiße Linie. Abnahme der Myzeldichte in der Zone des ersten Aufeinandertreffens der beiden Myzelien.
Cercosporella gegen Cercosporella	Bis zur Berührung	Abnahme der Myzeldichte in der Berührungszone. Nach der Berührung Einstellen des Wachstums der Hyphen.
Fusarium gegen Fusarium	3—4 Tage bis zu einem Abstand v. 2 mm	Ausbildung eines spindelförmigen Hemmungsraumes, dessen mittlere Breite 2 mm und dessen Länge 35—40 mm ist. Er ist hyphenfrei. Spindel an den Seiten nicht geschlossen. Ist die Kultur 4 Tage alt, so tritt vom Impfstück ausgehend in der ganzen Länge des Hemmungsraumes sektorartig rotes Pigment auf. In dieser Zone, die sich tiefrot färbt, treten nach 7 bis 8 Tagen tiefrote Acervuli auf. Zu dieser Zeit im Hemmungsraum spärliche, farblose Hyphen.
Helminthosporium geg. Helminthosporium	9 Tage bis in einem Abstand von 9 mm	Hemmung der Hyphen. Ausbildung eines Hemmungsraumes, dessen mittlere Breite 9 mm, und dessen seitliche 5 mm ist und der immer hyphenfrei bleibt.
Cladosporium gegen Cladosporium	Bis in einem Abstand von 8 mm	Ausbildung eines spindelförmigen Hemmungsraumes. Mittlere Breite 8 mm, seitliche 2,5 mm. Hemmungsraum von spärlichen, sporenfreien Hyphen durchzogen.
Alternaria gegen Alternaria	Bis zu einer Entfernung von 5 mm	Ausbildung eines spindelförmigen Hemmungsraumes. Mittlere Breite 5 mm, seitliche 1,5 mm. Vereinzelte, farblose Hyphen im Hemmungsraum. Nach 14 Tagen mittlere Breite des Hemmungsraumes 1,8—2 mm, also fast geradlinig und weist einzelne Sporen auf.
Penicillium gegen Penicillium	9 Tage bis zu einer Entfernung v. 6 mm	Ausbildung eines spindelförmigen, hyphenfreien Hemmungsraumes. Mittlere Breite 6 mm, seitliche 3 mm.
Mucor gegen Mucor	5 Tage bis zu einer Entfernung v. 2 mm	Ausbildung eines geradlinigen, 2 mm breiten Hemmungsraumes, der wenig Hyphen und keine Sporen aufweist.

3. Wechselseitige Beeinflussung verschiedener Pilze.

Nach Festlegung der wechselseitigen Beeinflussung gleicher Pilze war meine Hauptaufgabe, die mit der Fußkrankheit des Getreides meist auftretenden Pilze in ihrer Wirkung auf Ophiobolus zu prüfen.

Zu diesem Zwecke wurden die schon erwähnten Pilze gegen diesen Parasiten auf Agarplatten geimpft. Zu den Versuchen wurden (15 ccm) 1proz. Biomalzplatten verwandt. Gearbeitet wurde immer mit 5 Kontrollen und wenigstens 3 Wiederholungen.

Tab. 3. Wechselseitige Beeinflussung verschiedener Pilze.

Pilze	Dauer des normalen Wachstums	Abweichungen vom normalen Myzelwachstum
Ophiobolus gegen Cercosporella	Bis zur Berührung	Nach der Berührung stellen beide Pilze ihr Wachstum ein. Ophiobolus umwächst Cercosporella. Bei Ophiobolus Abnahme der Myzeldichte in der ersten Berührungszone. Bei Cercosporella Auftreten eines dunklen Pigmentsaumes an der Seite, die das Ophiobolus-Myzel berührt.
Ophiobolus gegen Fusarium	Bis zur Berührung	Nach der Berührung stellen beide Pilze ihr Wachstum ein. Bei Ophiobolus in der Berührungszone Abnahme der Myzeldichte in einer Länge von 40 mm. In der Fusarium-Kultur tritt sektorartig rote Farbstoffbildung ein. Stärkste Färbung in einer Linie am Nachbarmyzel, aus der nach kurzer Zeit wieder farblose Hyphen auswachsen, über das hyphenarme Ophiobolusmyzel. Dann erneute Hemmung unter starker Pigmentbildung und wieder das Auswachsen von farblosen Hyphen, die nach 35 Tagen bis zum Impfstück vom Ophiobolus vorgedrungen sind.
Ophiobolus gegen Helminthosporium	Bis zu einer Entfernung von 12 mm	Dann geradliniges Abplatten von Ophiobolus und Ausbildung eines dichten, weißen, 2 mm breiten Saumes eng verflochtener Hyphen. Bei Helminthosporium erst in einer Entfernung von 2 mm vom Nachbarmyzel Wachstumsstillstand (Abb. 1).
Ophiobolus gegen Cladosporium	Bis zur Berührung	Nach der Berührung Wachstumsstillstand auf beiden Seiten. Bei Ophiobolus Abnahme der Myzeldichte in der Berührungszone. Ophiobolus umwächst Cladosporium. Bei Cladosporium Fehlen der weißen, sporenfreien Randzone in der ersten Berührungszone (Abb. 2).
Ophiobolus gegen Alternaria	Bis zur Berührung	Bei Ophiobolus Abnahme der Myzeldichte in der Berührungszone. Alternaria dringt mit wenigen Hyphen in geringer Breite in die Nachbarkultur ein. Dann Wachstumsstillstand auf beiden Seiten.
Ophiobolus gegen Penicillium	Bis zu einer Entfernung von 5 mm	Dann geradliniges Abplatten von Ophiobolus. Ausbildung eines dichten, gelblichen, später gelbbraunen Hyphensaumes, dann Wachstumsstillstand. Hemmung der Penicilliumhyphen in einem Abstand von 4 mm. Nach einiger Zeit spärliches Auswachsen der primär gehemmten Hyphen bis dicht an das Nachbarmyzel. Spärliche Sporenbildung im Hemmungsraum (Abb. 3).
Ophiobolus gegen Mucor	Bis zu einer Entfernung von 2 mm	Dann schwache Abplattung von Ophiobolus. Ausbildung einer strähnigen Randzone. Mucor wächst normal an das Nachbarmyzel heran, dann vorübergehende Einstellung des Hyphenwachstums in der Berührungszone. Sehr langsames Überwachsen von Ophiobolus; in 40 Tagen hatten die Mucorhyphen einen Zuwachs von 15 mm.

Die einzelnen Pilze haben, wie aus den Vorversuchen hervorgeht, ein verschieden schnelles radiales Wachstum. Damit nun nicht ein sehr langsam wachsender Pilz von

einem, der eine sehr schnelle Anfangsentwicklung zeigt, überwachsen wurde, ehe der erstere sein Wachstum recht begonnen hatte, wurden Pilze, die nur eine geringe radiale Ausdehnung zeigten, früher geimpft, so daß die beiden Myzelien in der Mitte der Petrischale zusammentreffen konnten. Die Abweichungen vom normalen Wachstum sind in Tab. 3 zusammengefaßt.

Über die Beeinflussung von Ophiobolus durch die beschriebenen Pilze läßt sich zusammenfassend sagen, daß alle imstande sind, die radiale Ausdehnung von Ophiobolus zu verhindern. In einigen Fällen kann durch die Wirkung des Nachbarmyzels die Hyphendichte von Ophiobolus abnehmen, während sie in anderen durch Fremdbeeinflussung in der Randzone stark zunimmt. Jedoch können wir einige der hier untersuchten Pilze als in ihrer Wirkung auf Ophiobolus gleichartig in Gruppen vereinigen.

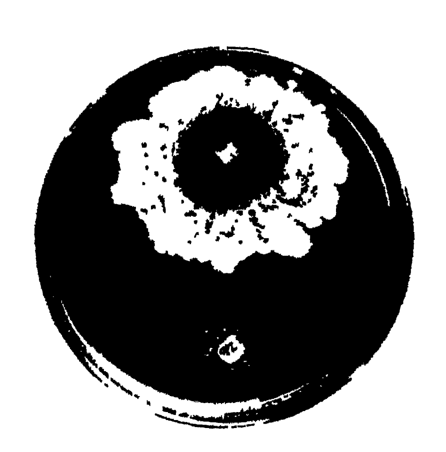


Abb. 1. Ophiobolus (oben) gegen Helminthosporium (unten).

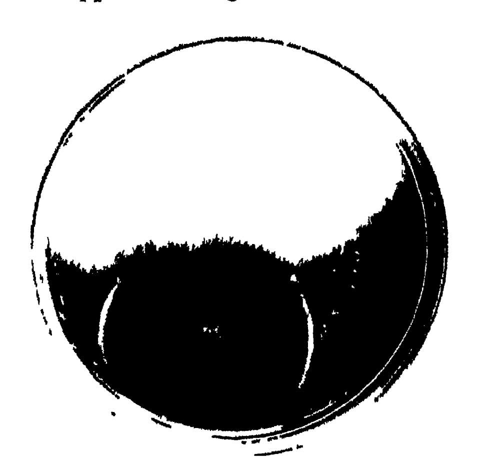


Abb. 2. Ophiobolus (oben) gegen Cladosporium (unten).

Cercosporella und Cladosporium werden von Ophiobolus ohne sichtliche Schädigung umwachsen. Anomal ist bei Ophiobolus nur die Abnahme der Myzeldichte besonders in der Zone der ersten Berührung der beiden Myzelien.

Im Prinzip ähnlich verhalten sich Alternaria, Fusarium und Mucor. Letzterer kann schon in einer Entfernung von 2 mm die Entwicklung von Ophiobolus beeinflussen, kenntlich durch ein schwaches Abplatten der Kultur und durch Ausbildung einer anomal strähnigen Randzone.

Fusarium und Alternaria bringen erst bei der Berührung das Wachstum der Ophiobolus-Hyphen zum Stillstand. Mucor und Fusarium vermögen die Ophioboluskultur, wenn auch nur sehr langsam, zu überwachsen.

Deutlich hemmenden Einfluß, kenntlich an einer markanten Abplattung der Ophiobolus-Kultur schon durch Fernwirkung, üben Helminthosporium und Penicillium aus. Durch die Einwirkung dieser beiden Pilze bildet Ophiobolus in der geradlinig abgeplatteten Zone einen dichten, gegen Penicillium braun pigmentierten Hyphensaum aus.

In den vorher beschriebenen Versuchen hatte sich gezeigt, daß besonders Fusarium prägnante Hemmungsbilder, gekennzeichnet durch lebhafte anomale Pigment- und Sporenbildung, zeigt. Deshalb impfte ich diesen Pilz auch noch einmal gegen Penicillium. Es ergaben sich folgende Resultate:

Fusarium gegen Penicillium.

Penicillium wurde 5 Tage früher geimpft als Fusarium. Entwicklung beider Pilze bis zu einer Entfernung von 5 mm vollkommen radial. Dann Hemmung der ersten Fusarium-Hyphen; nur die seitlichen wachsen noch nach, stellen dann aber in dem gleichen Abstand von der Penicillium-Kultur ihr Wachstum ein. Nach 4 Tagen Auftreten einer gelben, später gelbbraunen Farbstoffbildung in den zuerst gehemmten Fusarium-Hyphen. Vom Impfstück ausgehend, wird in einem sektorartigen Myzelausschnitt ein tiefroter Farbstoff gebildet; in dieser Zone Ausbildung einer großen Anzahl von Acervuli.

Entwicklung von Penicillium normal bis zu einer Entfernung von 4 mm von der Fusariumkultur. Dann Wachstumshemmung der ersten Hyphen. Ausbildung eines Hemmungsraumes, dessen mittlere Breite 4 mm, dessen seitliche 3 mm ist. In den Hemmungsraum werden von Penicillium unregelmäßig farblose Hyphen geschickt, die keine Sporen entwickeln. — Fusarium wächst nicht wieder aus.



Abb. 3. Ophiobolus (oben) gegen Penicillium (unten).

Dieser Versuch zeigt, daß Fusarium und Penicillium sich in ihrer Entwicklung stark zu beeinflussen vermögen.

Die Hemmung ist bei Fusarium folgendermaßen charakterisiert:

1. Wachstumshemmung schon in einer bestimmten Entfernung von Penicillium, die nicht überwunden werden kann.

2. Das Auftreten eines gelben, später braun-gelben dichten Hyphensaumes und anomale Pigmentbildung in den übrigen Teilen der Kultur.

3. Die Ausbildung der Acervuli.

Auch Penicillium erfährt eine Entwicklungshemmung durch das Nachbarmyzel schon durch Fernwirkung, die sekundär, aber nur ganz schwach, überwunden werden kann.

Es wurde noch ein Bakterium und zwar Bacillus coli in seiner Wirkung auf Pilze geprüft. Ich wählte gerade dieses Bakterium, da Sandford und Broadfoot (57) mit diesem eine starke Hemmung von Ophiobolus im Vegetationsversuch sehen konnten.

Bacillus coli impfte ich in einer 4 cm langen Strichkultur auf Biomalzplatten, und zwar stets 6 Tage früher als die zu diesen Versuchen verwandten Pilze: Ophiobolus, Fusarium und Penicillium.

Die in dieser Versuchsreihe geprüften Pilze überwachsen Bacillus coli vollkommen radial ungehemmt.

Nur Ophiobolus bildet eine Randzone aus strähnig verflochtenen Hyphen. Auf den Platten zeigte sich eine Pigmentierung in der Bac. coli abgewandten Seite der Kultur. Das Bakterium wurde stets von Ophiobolus überwachsen und ging dann zugrunde.

Da also Bac. coli kaum Resultate erwarten ließ, wurden keine weiteren Versuche damit ausgeführt.

Zur genauen Untersuchung des Hyphenverlaufs im Agar, besonders bei der Hemmung zweier Myzelien, verwandte ich Plattenkulturen, die in der schon angegebenen Weise hergestellt worden waren. Jede Schale enthielt 30 ccm 1proz. Biomalz-Agar. Um das Verhalten der Hyphen bei der gegenseitigen Annäherung zweier Myzelien zu

verfolgen, wurden aus der Hemmungszone viereckige Stuckchen herausgeschnitten und mikroskopisch beobachtet.

Zum Vergleich verfertigte ich in derselben Art Schnitte durch die Randzone von Einzelimpfungen.

Der Hyphenverlauf der einzelnen Pilze wird nachfolgend in knapper Form zusammenfassend angegeben.

Von den hier untersuchten Pilzen wird mit Ausnahme von Mucor das Substrat im ganzen Querschnitt von Hyphen durchzogen, nur nimmt im unteren Teil die Myzeldichte ab. Bei Einzelimpfungen haben die peripheren Hyphen gleiche Länge wie bei Fusarium (Abb. 4). Cladosporium, Alternaria, Penicillium, Mucor, oder die Länge der Hyphen nimmt im unteren Teil des Substrates ab, wie bei Ophiobolus, Cercosporella und Helminthosporium. Beim Gegeneinanderwachsen zweier Myzelien können die peripheren Hyphen unverändert in einer bestimmten Entfernung ihr Wachstum einstellen, wie z. B. Helminthosporium, Alternaria, diese können in geringer Breite gradlinig ineinanderwachsen, wie bei Ophiobolus und Cercosporella, oder sie werden in den unteren Teil des Substrates abgelenkt, wie Fusarium (Abb. 5), Cladosporium. Penicillium und Mucor.

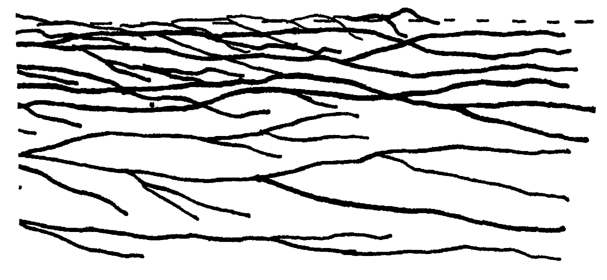


Abb. 4. Normaler Hyphenverlauf von Fusarium culmorum.

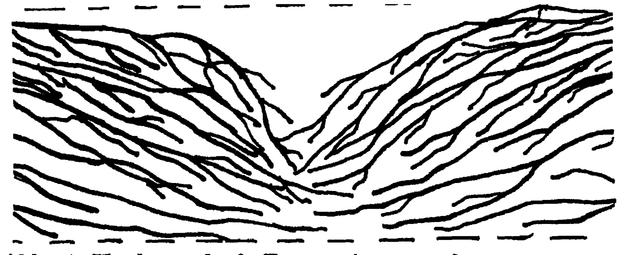


Abb. 5. Hyphenverlauf: Fusarium culmorum gegen Fusarium culmorum.

Vor der Berührungszone der beiden Myzelien kann die Myzeldichte abnehmen, wie bei Ophiobolus, Cercosporella; sie kann zunehmen, wie bei Fusarium, Cladosporium und Penicillium, oder sie bleibt fast unverändert wie bei Helminthosporium, Alternaria und Mucor.

Impft man die hier beschriebenen Pilze gegen Ophiobolus, so ist die Reaktion der Hyphen, wenigstens der Richtung nach, immer die gleiche. Pilze, die bei der Hemmung durch ein Myzel der gleichen Art mit einer Ablenkung reagieren, zeigen diese auch, wenn sie gegen Ophiobolus wachsen.

Bei Ophiobolus wird außerdem durch die Einwirkung anderer Pilze die Dichte des Myzels verändert. So nimmt die Hyphendichte von Ophiobolus ab, wenn dieser Pilz gegen Cercosporella, Fusarium, Cladosporium oder Alternaria geimpft wird. Immer wird beim Einstellen des Wachstums die Längendifferenz zwischen den peripheren Hyphen und denen im unteren Teil des Substrates wesentlich verringert.

Eine Verdichtung der Hyphen von Ophiobolus bei der Hemmungsraumbildung kommt durch die Einwirkung von Penicillium zustande. In einer dichten geraden Linie, die sich durch das ganze Substrat zieht, stellen die Ophiobolus-Hyphen ihr Wachstum ein.

Ein besonders charakteristisches Hemmungsbild zeigt Ophiobolus in der Nähe einer Helminthosporium-Kultur. An der Peripherie der Kultur bildet sich in der oberen Hälfte ein sehr dichter Hyphensaum. Im unteren Teil bleiben die Hyphen etwas in der Entwicklung zurück (Abb. 6).



Abb. 6. Hyphenverlauf Helminthosporium sativum (links) gegen Ophiobolus graminis (Sacc.) (rechts) (Mikro-Aufnahme des Hyphensaumes. Vergrößerung 8×.)

B. Versuche zur ursächlichen Klärung der Hemmungsraumbildung von Pilzen in Agar-Kulturen.

1a. Die Abhängigkeit der Hemmungsraumbreite von der Substratmenge.

Im Rahmen dieser Untersuchungen über die Ursache der Hemmungsraumbildung wurde zunächst geprüft, wieweit die Angaben vieler Autoren[1]), daß Nährstoffmangel für die gegenseitige Hemmung verantwortlich sei, zu Recht besteht. Zu diesen Versuchen wählte ich die Methodik von Schmidt (61), der auf verschiedenen dicken Agar-Schichten Pilze gegeneinander impfte. Aus der Tatsache, daß die Hemmungsraumbreite mit der Schichtdicke zunimmt, zog er den Schluß, daß Nährstoffmangel die Ursache der Hemmung ist.

Ich verwandte zu meinen Versuchen Petrischalen-Kulturen mit 10,15 bzw. 30 ccm 1proz. Biomalz-Agar, die mit Fusarium, Helminthosporium und Alternaria beimpft wurden.

Allgemein war festzustellen, daß mit der größeren Schichtdicke das Myzelwachstum üppiger wurde. Das Myzel war auf den größeren Agarmengen entschieden dichter und zeichnete sich durch reichliche Luftmyzelbildung aus. Die Breite der Hemmungsräume schien dagegen bei oberflächlicher Betrachtung nicht zu differieren. Entfernte ich aber das Luftmyzel, das besonders in der Berührungszone reichlich gebildet wurde und das den Hemmungsraum teilweise verdeckte, so ließ sich mit zunehmender Agar-Schicht eine Abnahme der mittleren Hemmungsraum-Breite feststellen.

Die gefundenen Werte für die einzelnen Pilze und Agarschichten sind in der nachfolgenden Tab. 4 angegeben.

[1]) Schmidt (61), Liesegang (37), Boas (6).

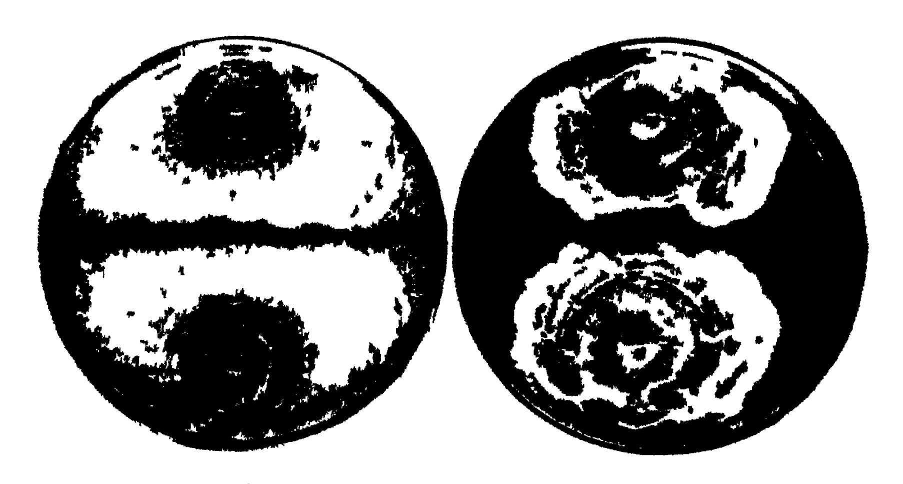
Diese Ergebnisse stimmen mit den von Schmidt (61) gewonnenen Resultaten uberein

Da man jedoch den Einwand machen konnte, daß neben der Veranderung der Nahrstoffmenge durch die verschiedene Schichtdicke gleichzeitig auch die Diffusionsverhaltnisse im Agar geandert werden konnten suchte ich im folgenden Versuch diesen Fehler auszugleichen

Tab 4 Hemmungsraumbreite auf verschieden hohen Agarschichten gleicher Konzentration

Pilze die gegeneinander geimpft wurden	10 ccm Agar 1%	15 ccm Agar 1%[1]	30 ccm Agar 1%
Fusarium	3 5 mm	2 5 mm	2 mm
Helminthosporium	14 5 mm	12 mm	11 mm
Alternaria	8 mm	6 mm	2,5 mm

[1]) Die hier auf 15 ccm 1proz Biomalz Platten gefundenen Werte fur die Hemmungsraume liegen durchweg hoher als fur diese Pilze in einem fruheren Kapitel (A 2) angegeben wurde da hier die Lufthyphen entfernt sind



Helminthosporium sativum

1% Biomalz Agar (15 ccm) 3% Biomalz Agar (15 ccm)

Abb 7 Hemmungsraumbreite auf gleich hohen Agarschichten verschiedener Konzentration

1b Die Abhangigkeit der Hemmungsraumbreite von der Nahrstoffkonzentration bei gleicher Substratmenge

Die Schichtdicke wurde in dieser Versuchsreihe konstant gehalten und nur die Nahrstoffmenge variiert Bei dieser Methodik sollen nach Schmidt (61) die gleichen Ergebnisse erzielt werden wie durch Veranderung der Schichtdicke

Die gewonnenen Werte fur die mittlere Hemmungsraumbreite sind in nachfolgender Tab 5 angegeben

Tab. 5. Hemmungsraumbreite auf Agarschichten gleicher Hohe und verschiedenen Konzentrationen.

Pilze, die gegeneinander geimpft wurden	15 ccm 1% Agar	15 ccm 2% Agar	15 ccm 3% Agar
Fusarium	2,5 mm	2,5 mm	2,5 mm
Helminthosporium	12 mm	14 mm	18 mm
Alternaria	6 mm	6 mm	7 mm

Diese Ergebnisse stimmen mit gleichgerichteten Versuchen von Schmidt (61) nicht überein. Im Gegenteil, während dieser bei hohem Nährstoffgehalt eine Verringerung der Hemmungsraum-Breite fand, stellte ich in meinen Versuchen keinen Unterschied in der Breite dieser Zone bei Fusarium fest.

Bei den anderen Pilzen war sogar mit der Erhöhung der Nährstoffkonzentration der Hemmungsraum breiter geworden (Abb. 7).

Hätte man nach dem Ergebnis des ersten Versuches die Hemmungsraumbildung auf Nährstoffmangel zurückführen können, so wird nach diesen letzten Resultaten Nährstoffmangel als Ursache zweifelhaft.

2. Die Hemmungsraumbildung beim Übergang der Hyphen von nährstoffreichem in nährstoffarmes bzw. nährstofffreies Medium.

1. Versuch.

Ist Nährstoffmangel ein wesentlicher Faktor für die Ausbildung des Hemmungsraumes, so müßte seine Breite auf einem nährstofffreien Medium, wenn hier noch ein Wachstum möglich ist, zunehmen.

Darum verwandte ich für weitere Versuche folgenden Nährboden, der nach der Analyse von Küster (36) als nährstofffrei zu bezeichnen ist. 20 g Agar-Agar werden mit 1000 ccm Aqua dest. flüssig gemacht, in große Schalen gegossen, nach dem Erkalten in Streifen geschnitten und in Aqua dest., das täglich 2 × erneuert wird, 8 Wochen lang gewässert[1]). Der so behandelte Agar wurde ohne jeden Zusatz, und zwar in Mengen von 15 ccm je Petrischale als Substrat fur die Versuche benutzt.

Gearbeitet wurde mit 5 Kontrollen. Jede Versuchsreihe wiederholte ich 2 ×.

Zunächst prüfte ich das normale Wachstum aller Pilze auf reinem Agar. Die Abweichungen der Myzelentwicklung von der auf 1% Biomalzplatten wird im folgenden für alle Pilze zusammenfassend angegeben.

Die radiale Ausdehnung der Myzelien war auf dem nährstofffreien Substrat bei allen hier untersuchten Pilzen durchweg entschieden größer als auf 1% Biomalz-Agar.

Bei Cercosporella war die Differenz der Kulturdurchmesser (auf reinem Agar und auf 1proz. Biomalz-Agar) z. B. bei einem Alter von 16 Tagen 23 mm. Die Dichte des Myzels hatte aber stark abgenommen.

Bei Fusarium war es nur noch mikroskopisch sichtbar. Luftmyzelbildung fehlte. Pigment trat nur in den bei Cladosporium, Alternaria und Penicillium spärlich erzeugten Sporen auf.

Diese Versuche zeigen, daß auf diesem nährstofffreien Substrat bei allen Pilzen noch ein Wachstum möglich ist, daß die radiale Myzelausdehnung sogar stark zunimmt. Hieraus ergibt sich, daß die Größe des Kulturdurchmessers, das übliche Maß für die Bewertung des Myzelwachstums auf einer Plattenkultur, keine sichere Auskunft geben kann über die Entwicklungsmöglichkeiten, die der Pilz auf dem Substrat findet.

---

[1]) Nach Küster sind die restlichen Nährstoffe schon nach 8 Tagen ausgewässert.

Tab. 6. Wechselseitige Beeinflussung gleicher Pilze auf nährstofffreiem Medium. (Abweichungen vom normalen Wachstum.)

Pilze	Abweichungen vom normalen Wachstum auf 1proz. Biomalz-Agar
Ophiobolus gegen Ophiobolus	Abnahme der Myzeldichte in einer Breite von 10 mm in der Berührungszone (Hyphen sind hier nur mikroskopisch sichtbar). Die Hyphen wachsen ohne Ablenkung in das gegenüberliegende Myzel.
Fusarium gegen Fusarium	Ausbildung eines spindelförmigen, hyphenfreien Hemmungsraumes, etwas breiter als auf 1proz. Biomalz-Platten, der zu beiden Seiten Sporen in relativ großer Zahl aufweist, wie in keinem anderen Teil der Kultur.
Helminthosporium gegen Helminthosporium	Abnahme der Myzeldichte in der Berührungszone der Myzelien. Die Ausbildung eines Hemmungsraumes fehlt. Hyphen gehen in die Nachbarkultur über.
Cladosporium gegen Cladosporium	Abnahme der Myzeldichte in der Berührungszone der beiden Kulturen. Die Hyphen gehen aber in das Nachbarmyzel. Die Ausbildung eines Hemmungsraumes fehlt.
Penicillium gegen Penicillium	Ausbildung eines typischen Hemmungsraumes, der etwas breiter ist als auf 1proz. Biomalz-Platten und hyphenfrei ist.
Alternaria gegen Alternaria	Myzeldichte nimmt ab in der Berührungszone der Hyphen. Die Ausbildung eines Hemmungsraumes fehlt.

Die Abweichungen, die sich nun beim Gegeneinanderimpfen zweier Pilze auf diesem nährstofffreien Substrat in der Breite des Hemmungsraumes im Vergleich zu den Versuchen auf 1% Biomalz ergaben, sind für die einzelnen Pilze kurz angeführt. (Tab. 6.)

Wie die Ergebnisse zeigen, wird auf einem nährstofffreien Agar der Hemmungsraum nur bei Fusarium und Penicillium etwas breiter als auf 1% Agar, bei allen anderen Pilzen nimmt er an Breite ab bzw. wird er gänzlich aufgehoben.

Dieses Resultat spricht ebenfalls deutlich gegen die Ansicht, daß Nährstoffmangel die hauptsächlichste Ursache der Hemmung sei; denn wäre diese Erklärung zutreffend, so müßte gerade auf dem nährstoffarmen Medium stets der Hemmungsraum sehr breit sein.

2. Versuch.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde das Verhalten der Pilze auf einem Agarnährboden geprüft, der sich aus Agarhälften verschiedener Nährstoffkonzentration zusammensetzte.

Die Methodik war folgende: Ich goß eine Anzahl Petrischalen mit nährstofffreiem, gewässerten Agar (15 ccm). Nach dem Erkalten wurde die eine Hälfte entfernt. In den leeren Schalenraum goß ich sterilen, 1proz. Biomalz-Agar, und zwar so, daß die beiden Hälften genau gleiche Höhe hatten und nach dem Erkalten in einer geraden Linie fest aneinander schlossen. Nur an ganz geringen Farbdifferenzen waren die beiden Agarhälften zu erkennen. Sofort nach dem Erkalten impfte ich die Pilze[1]) einmal genau auf die Trennungslinie der beiden Agarhälften, ferner einmal auf die Biomalzseite, in anderen Versuchen auf die nährstofffreie Agarhälfte.

Außerdem blieb bei einer Anzahl 1proz. Biomalz-Platten eine Schalenhälfte überhaupt leer.

Ist nun Nährstoffmangel die Ursache der Hemmungsraumbildung, so müßte beim Impfen auf die Biomalz-Seite das Wachstum der Pilze bereits

[1]) In dieser Versuchsreihe: Penicillium, Alternaria und Helminthosporium.

etwas vor der Trennungslinie der beiden Agarhälften aufhören. Auf keinen Fall dürfte der Pilz in den leeren Schalenraum sein Myzel entwickeln, wie es Schmidt (61) für die Phykomyzeten feststellte. Umgekehrt müßte beim Impfen auf die nährstofffreie Agarhälfte das Myzelwachstum bereits vor der Mittellinie der beiden Agarhälften ein wesentlich besseres sein.

In dieser Versuchsreihe wurde mit denselben Pilzen gearbeitet.

Die Auswertung der Versuche ergab, daß das Pilzwachstum immer vollkommen radial war. Der Übergang von Hungermyzel, das immer auf nährstofffreiem bzw. -armem Substrat gebildet wird, in das üppige Biomalz-Myzel und umgekehrt, fiel mit Ausnahme von Helminthosporium stets genau mit der Trennungslinie der beiden Agarhälften zusammen. Nur bei diesem Pilz begann beim Impfen auf die nährstofffreie Agarseite bereits einige Millimeter vor der Trennungslinie die Ausbildung des Biomalz-Myzels.

Impfte man auf die Trennungslinie der beiden Agarhälften, so war die Pilzkultur vollkommen radial. In den reinen Agar wurde Hungermyzel, in den Biomalz-Agar das für diesen charakteristische üppige Myzel gebildet. Bei allen Pilzen trennte genau die Mittellinie die beiden Myzelarten, nur Helminthosporium wuchs mit einem üppigen Myzel an, zeigte aber bei einem Durchmesser von 20 mm auch die übliche Differenzierung.

In den Kulturreihen, bei denen die eine Schalenhälfte ohne Agar war, entwickelten sich alle Pilze vollkommen normal in den leeren Schalenraum — nur die Myzeldichte nahm etwas ab — sie erreichten z. T. sogar den gegenüberliegenden Schalenraum.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Helminthosporium offensichtlich eine besondere Fähigkeit der Nährstoffaneignung besitzt, da dieser Pilz ja in der Lage ist, bereits vor dem Erreichen der nährstoffreichen Zone das üppige Biomalz-Myzel zu bilden, dieses noch in dem reinen Agar zu erzeugen, wenn er aus dem Biomalz-Substrat kommt und auch mit diesem Myzel radial anzuwachsen.

Auch alle diese Versuche sprechen gegen Nährstoffmangel als alleinige Ursache der Hemmungsraumbildung; denn sonst dürften im extremsten Falle des Nährstoffmangels (leere Schalenhälfte) die Hyphen nicht in den leeren Schalenraum wachsen.

Kommen die Pilze aus dem nährstoffreichen Substrat in das nährstoffarme, so antworten sie zwar alle mit der Ausbildung des Hungermyzels, das aber stets vollkommen radial ist. Niemals findet eine Einstellung des Wachstums oder Abplattung statt.

Würde beim Aufeinanderwachsen zweier Myzelien zwischen beiden nur Nährstoffmangel die Ursache der Hemmungsraumbildung sein, so müßte in ihm wenigstens ein Hungermyzel zur Ausbildung kommen.

Wie die ersten Versuche zeigen, bleibt der Hemmungsraum aber oft vollständig hyphenfrei.

C. Die wechselseitige Beeinflussung von Pilzen in Nährlösungen.

1. Das Wachstum von Ophiobolus, Cercosporella, Helminthosporium, Cladosporium, Alternaria, Penicillium und Mucor in der Nährlösung.

Aus dem wechselseitigen Verhalten der verschiedenen Pilze auf Agar war zu erkennen, welche Pilze sich in ihrer Entwicklung hemmen. Es ließ sich auch ein gewisses Urteil gewinnen über den Grad der Hemmung und

über die spezifische Art der Beeinflussung eines Pilzes durch ein entgegenwachsendes Myzel, wie z. B. Verminderung der Hyphenzahl in der Hemmungszone, anomale Sporen- und Pigmentbildung usw. Man konnte mit dieser Methode zeigen, daß die Hemmung sich nicht allein mit Nährstoffmangel erklären läßt, da einerseits die typischen Hemmungsbilder niemals zur Entstehung kommen, wenn ein sich radial ausbreitender Pilz eine nährstoffarme oder sogar -freie Zone erreicht, sondern nur beim Zusammentreffen der Myzelien bestimmter Pilze.

Andererseits ist die Breite des Hemmungsraumes durchaus nicht abhängig von dem Nährstoffgehalt des Substrates in der Art, daß immer einer hohen Nährstoffkonzentration ein schmaler, einer niederen ein breiter Hemmungsraum entspräche, wie Schmidt (61) für die Phykomyzeten angibt. Vielmehr konnte einwandfrei festgestellt werden, daß im nährstofffreien Agar eine Hemmungsraumbildung ganz unterbleiben kann, daß bei gleicher Schichtdicke, aber verschiedener Nährstoffkonzentration in einigen Fällen der größeren Nährstoffmenge der breitere Hemmungsraum entsprach.

Könnte man für das langsamere Wachstum der Hyphen von Helminthosporium, Cercosporella und Ophiobolus im unteren Teil des Agarquerschnittes gegenüber denen im oberen Teil des Substrates vielleicht Sauerstoffmangel verantwortlich machen, so läßt sich mit diesem doch auf keinen Fall die Hemmungsraumbildung erklären, da bei der Berührung zweier Myzelien:

1. die Längenunterschiede der Hyphen in den verschiedenen Substratschichten oft vollkommen ausgeglichen werden,

2. sehr häufig eine Ablenkung der Hyphen in den unteren Teil des Substrates erfolgt, also in die sauerstoffarme Zone.

Um einen Überblick zu gewinnen, wieweit sich unter dem Einfluß des Pilzwachstums das Nährmedium verändert und wieweit diese Veränderungen eine Ursache der Hemmung sein können, vor allem aber um einen graduellen Maßstab für die Stärke der Hemmung zu gewinnen, wurden ähnlich gerichtete Versuche in Flüssigkeitskulturen angelegt.

Ebenso wie in den Versuchsreihen mit Agar war es auch hier erstes Erfordernis, ein Nährmedium zu wählen, auf dem alle untersuchten Pilze günstiges Wachstum zeigen. Da die beiden Hauptparasiten Ophiobolus und Cercosporella auf anorganischen Nährlösungen bekannter Zusammensetzung nur kümmerlich gedeihen, mußte ein organisches Nährsubstrat verwandt werden. Dadurch wurden leider quantitative Untersuchungen über den Verbrauch der einzelnen Nährstoffe durch die Pilze bei dem Umfang dieser Versuche nicht möglich.

Wie bei den Plattenkulturen wurden auch für die Kulturen in Nährlösung zunächst die Wachstumsdaten der einzelnen Pilze festgelegt. Als Nährlösung kam ein Weizenextrakt zur Anwendung, bei dessen Herstellung peinlichst genau verfahren werden muß, um gute Vergleichswerte zu erzielen. Die Herstellungsmethode wird darum genauer angegeben.

Herstellung des Weizenextraktes.

1 kg geschrotener Weizen (Karstens V Winterweizen)[1]) wird mit 3000 ccm Aqua dest. 2 Std. lang auf 75—80° C erhitzt, zur Entfernung der groben Bestandteile durch ein Tuch gepreßt und anschließend die durchgepreßte Flüssigkeit durch Faltenfilter (Schleicher und Schüll, 597) filtriert[2]). 1 l dieses Filtrates wird mit Aqua dest. auf 4 l aufgefüllt und ½ Std. lang bei 1,2 Atm. sterilisiert. Es bildet sich ein grauer Niederschlag, der nach 24 Std. abfiltriert wird. In 300 ccm Erlenmeyer-Kolben füllt man 100 ccm Filtrat, das nochmals ½ Std. lang bei 1,2 Atm. sterilisiert wird.

[1]) Andere Weizensorten ergeben abweichende Werte.

[2]) Es ist notwendig, daß das Filtrat in spätestens 2½ Std. durchgelaufen ist, da sonst Umsetzungen eintreten, die kenntlich sind am Geruch und am Sinken des ph-Wertes (von 6,35 auf 4,7).

Die klare, goldgelbe Lösung, die einen ph-Wert von 6,35 hatte, wurde mit den schon erwähnten Pilzen in der schon früher angegebenen Weise beimpft. Nur von Mucor und Penicillium, die sehr viel Sporen erzeugen, wurden, um gute Vergleichswerte zu erzielen, 1 Tag alte Einspor-Kulturen in die Kolben gebracht.

Alle Versuchsreihen, die mit je 6 Kontrollen durchgeführt wurden, setzte ich zur Sicherung der Ergebnisse bei einer Temperatur von 22,5—23,5° C mit zwei zeitlich getrennten Wiederholungen an.

Von den einzelnen Pilzen machte ich nach 4 Wochen Erntegewichtsbestimmungen[1]). Die Myzeldecken wurden mit der Platinnadel abgehoben, mit Wasser ausgewaschen und bis zur Gewichtskonstanz, die nach 36 Std. erreicht war, getrocknet. Die Art des Wachstums der hier untersuchten Fungi auf Weizenextraktlösung sei im folgenden kurz angegeben:

Tab. 7. Wachstum der Pilze auf Weizenextraktlösung.

Pilze	Bemerkungen
Ophiobolus	Myzeldecke dicht, einheitlich und lederartig, in den ersten 3 Wochen pigmentlos. Dann Auftreten dunkler, schwarzgrüner Pigmentflecke, meist im Zentrum der Kultur. Sporen und Luftmyzelbildung fehlen.
Cercosporella	Anwachsen erfolgt mit einer Anzahl submerser Myzelflocken, obwohl mit einem einheitlichen Agarstück geimpft wurde. Haben diese die Oberfläche erreicht, erfolgt Ausbildung einer einheitlichen grau-grünen Myzeldecke mit grauem Luftmyzel.
Fusarium	Anwachsen erfolgt mit einem lockeren, weißen Myzel, das sich schnell zu einer einheitlichen, dichten Decke entwickelt. Nach 10—14 Tagen Auftreten des ersten Farbstoffes am Rande der Kultur, der anfangs rosa, später rot wird. Nach 3 Wochen Ausbildung vereinzelter weißer, manchmal gelblicher Luftmyzelflocken und Auftreten dunkelroter Acervuli an der Peripherie der dichten, schleimigen Myzeldecke.
Helminthosporium	Myzeldecke dick, einheitlich, mit lockerem, hellgrünen Luftmyzel. Farbe der Myzeldecke schwärzlich-grau.
Cladosporium	Myzeldecke sehr dick, brüchig und schwarz-grün gefärbt. An der Oberfläche in großer Zahl dunkelgrüne Sporen.
Alternaria	Myzeldecke dünn, lederfarben, aber einheitlich. An der Oberfläche grün gefärbte Sporen in großer Zahl.
Mucor	Myzeldecke locker, weiß und einheitlich, mit viel Luftmyzel und Sporenköpfchen, die die Myzeldecke grau-weiß erscheinen lassen.

Tab. 8. Myzelgewichte der Pilze und die ph-Werte der Nährlösungen, die 4 Wochen von den Pilzen bewachsen waren.

Frische Nährlösung beimpft mit	Myzelgewichte g	ph-Werte
Ophiobolus	0,6154 ± 0,0047	6,35
Cercosporella	0,5544 ± 0,0042	6,85
Fusarium	0,5878 ± 0,124	5,37
Helminthosporium	0,6156 ± 0,0052	6,00
Cladosporium	0,9267 ± 0,0057	5,88
Alternaria	0,8932 ± 0,0034	4,79
Penicillium	0,3149 ± 0,0022	4,80
Mucor	0,1536 ± 0,0027	8,50
Ausgangslösung	—	6,35

[1]) Cercosporella herpotrichoides de Not wächst sehr langsam; darum wurden hier erst nach 8 Wochen die Myzelgewichte bestimmt.

Von den Kulturlösungen der einzelnen Pilze wurden die ph-Werte bestimmt, die zusammen mit den gefundenen Zahlen für die Myzel-Gewichte in der Tabelle 8 zusammengestellt sind.

Aus diesen Werten ersieht man, daß durch die Einwirkung der Pilze, mit Ausnahme von Ophiobolus, eine Verschiebung des ph-Wertes erfolgen kann. Alternaria und Penicillium verändern die Wasserstoffionenkonzentration stark nach der sauren, Mucor nach der alkalischen Seite hin.

2. Die Beeinflussung des Wachstums von Ophiobolus auf steril filtrierten Nährlösungen, in denen vorher die unter C. 1 genannten Pilze gewachsen waren.

Die Frage, die es nun zunächst zu entscheiden galt, war, ob und wieweit durch das Wachstum eines Pilzes der Nährboden für das Gedeihen eines anderen, und zwar in unserem Fall für Ophiobolus verschlechtert werden kann.

Darum wurde Ophiobolus auf die gebrauchten Nährlösungen der schon erwähnten Pilze gebracht.

Um eine Veranderung der Losung durch eine Hitzesterilisation zu vermeiden, wurde diese zunächst durch K-Filter der Firma Seitz (Größe 6, Nr. 3) geklärt, dann durch EK-Filter (Seitz, EK, Große 6, DRP. 388 531 a) entkeimt. Zur sterilen Abfüllung der so keimfrei gemachten Nahrlosung wurde der in Abb. 8 dargestellte Apparat angefertigt.

Die gesamte Apparatur wurde einschließlich Entkeimungstrichter und EK-Filter vor der Benutzung ½ Std. lang bei 1,2 Atm. sterilisiert.

Die Methode des Filtrierens war folgende: Die geklarte Losung wurde in den EK-Trichter „a" gebracht und mit Preßluft durch das EK-Filter „b" in den Vorratsbehalter „c", der aus Neusilber besteht, gepreßt. Den Trichter „a" kann man ohne Gefahr einer Verunreinigung stets wieder durch die Öffnung „d" nachfullen. Zur Vermeidung eines Überdruckes ist beim Filtrieren der Hahn „f" zu öffnen, der nach dem Durchpressen sofort wieder geschlossen wird. Aus dem Behälter „c" wird durch Öffnen des Hahnes „e" die graduierte Pipette „h" bis zur gewünschten Höhe gefullt in dieser ersten Versuchsreihe auf 50 ccm und durch Öffnen des Hahnes „f" in sterile 300 ccm Erlenmeyer-Kolben gebracht. Vor dem Öffnen des Hahnes „f" wurde die aus Neusilber bestehende Ausmündung der Pipette „g" durch Abflammen sterilisiert. Die Kolben beimpfte ich mit Ophiobolus und brachte sie in den Thermostaten.

Nach 3 Wochen wurden in allen Reihen die Myzelgewichte bestimmt, die im nachfolgenden angegeben werden.

Auf den Filtraten von Penicillium, Helminthosporium und Alternaria wuchs Ophiobolus überhaupt nicht mehr an, während bei den Nährlösungen, auf denen die übrigen Pilze gewachsen waren, nur ein meist submerses weißes Myzel von sehr geringer radialer Ausdehnung gebildet wurde.

Für die Myzelgewichte von Ophiobolus in den verschiedenen Kulturlosungen ergaben sich folgende Werte, die mit denen der Kontrollreihe (50 ccm

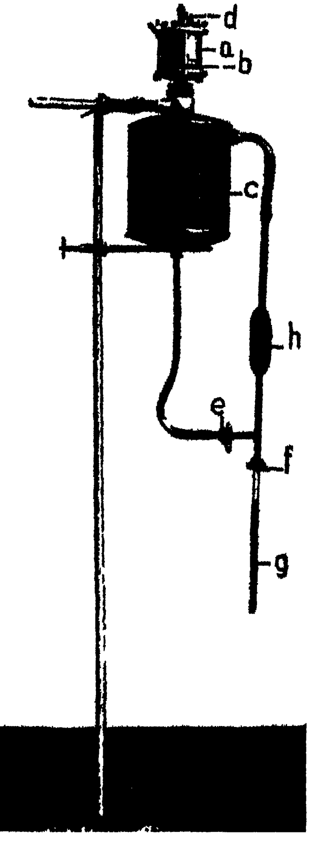


Abb. 8. Apparat zum sterilen Abfüllen des EK-Filtrates.

frische Weizenextraktlösung) und für die Wachstumshemmung[1]) in Tab. 9 zusammengestellt sind.

Tab. 9. Myzelgewichte von Ophiobolus auf den gebrauchten Nährlösungen anderer Pilze und ihre Differenz mit denen auf frischer Nährlösung.

Nährlösung, vorher bewachsen durch	Myzelgewichte g	Wachstumshemmung
Ophiobolus	0,0151 ± 0,0011	0,3456
Cercosporella	0,0262 ± 0,0009	0,3345
Fusarium	0,0261 ± 0,0017	0,3346
Helminthosporium	—	0,3607
Alternaria	—	0,3607
Cladosporium	0,0170 ± 0,0021	0,3437
Penicillium	—	0,3607
Mucor sp.	0,0602 ± 0,0016	0,3005
Kontrolle	0,3607 ± 0,0020	—

Man sieht aus den vorliegenden Werten, daß Ophiobolus auf Nährlösungen, die vorher von anderen Pilzen oder von ihm selbst besiedelt waren, eine starke Hemmung erfährt.

Im Mittelpunkt des Interesses stand jetzt die Frage nach der Ursache der Hemmung.

D. Versuche zur ursächlichen Klärung der Wachstumshemmung von Ophiobolus auf Nährlösungen, die vorher von anderen Pilzen besiedelt waren.

1. Einfluß des ph-Wertes auf das Wachstum von Ophiobolus.

Um den Einfluß des ph-Wertes, der durch Penicillium und Alternaria stark nach der sauren Seite hin verändert wird (s. Tab. 4) und der nach den Angaben einiger Autoren[2]) das Wachstum der Pilze beeinflussen kann, auf die Entwicklung von Ophiobolus zu prüfen, wurde eine besondere Versuchsreihe angesetzt.

Zur Anwendung kam Weizenextrakt, dessen ph 4,7 war[3]), also tiefer als der der sauersten gebrauchten Nährlösung. Auf die sterile Lösung impfte ich Ophiobolus.

Nach etwas verzögertem Anwachsen bildete dieser Pilz auf der Nährlösung eine dichte einheitliche Decke, die nur etwas mehr Pigment zeigte als die in normalen Weizenextraktlösungen (ph = 6,35). Nach 3 Wochen wurden die Myzelgewichte von Ophiobolus bestimmt,

$$M = 0{,}2561 \pm 0{,}00213.$$

Obwohl das Wachstumsoptimum für Ophiobolus im alkalischen Gebiet liegt[4]), ist, wie dieser Versuch zeigt, die Entwicklung dieses Pilzes bei einem ph von 4,7 noch so gut, daß wir die vollkommene Sistierung des Wachstums von Ophiobolus auf den vorher mit Alternaria oder Penicillium bewachsenen Nährlösungen auf keinen Fall mit der Veränderung der Azidität allein erklären können.

[1]) Die Werte für die Wachstumshemmung sind gleich der Differenz zwischen den Myzelgewichten auf 50 ccm frischer und 50 ccm Nährlösung, auf der vorher andere Pilze gewachsen waren.

[2]) Nikitinsky (45), Millard & Taylor (39).

[3]) Es wurde mit Zitronensäure angesäuert.

[4]) Schaffnit und Meyer-Hermann (60).

2. Beeinflussung der Wachstumshemmung durch Zusatz frischer Nährlösung.

Müssen wir nach dem eben beschriebenen Versuch die Veränderung des ph-Wertes als Ursache für das mangelhafte Wachstum von Ophiobolus auf Nährlösungen, die vorher von anderen Pilzen bewachsen waren, ausschließen, so könnte als weiterer Grund Nährstoffmangel in Frage kommen. Zur Klärung der Nährstofffrage wurde deshalb folgender Versuch angesetzt.

Als Ausgangslösung wurde 50 ccm EK-Filtrat[1]) verwandt. In anderen Versuchsreihen wurde diesem Filtrat im Verhältnis 4 : 1[2]), 1 : 1 und 1 : 4 frische Nährlösung zugesetzt. Immer war die gleiche Gesamtflüssigkeit vorhanden.

Als Kontrolle zu jeder dieser Reihen diente frische Nährlösung, in der an Stelle des EK-Filtrates im gleichen Verhältnis Aqua dest. zugesetzt wurde.

Jede Versuchs- und Kontrollreihe wurde mit 6 Kulturen angesetzt, jede Reihe wenigstens zweimal wiederholt.

War die Hemmung von Ophiobolus auf reinem EK-Filtrat eine Folge des Nährstoffmangels, so mußte dieser Pilz bei Zusatz von frischer Nährlösung hier dieselben Myzelgewichte erbringen, wie auf den Kontrollösungen. Die gefundenen Werte werden anschließend angegeben. Zuvor sei kurz zusammenfassend über das Wachstum von Ophiobolus berichtet.

Soweit in den Versuchs- und auch in den Kontrollreihen ein Anwachsen von Ophiobolus erfolgte, nahm mit der Zugabe einer größeren Quantität frischer Nährlösung die Myzeldichte, die Größe der Pilzdecke und die Pigmentbildung zu.

Die Myzelgewichte von Ophiobolus sind in Tab. 10 zusammengestellt.

Tab. 10. Ophiobolus auf gebrauchter Nährlösung[1]).

Nlg., vorher bew. durch	50 ccm EK-Filtrat	40 ccm EK-Filtrat + 10 ccm fr. Nlg.	25 ccm EK-Filtrat + 25 ccm fr. Nlg.	10 ccm EK-Filtrat + 40 ccm fr. Nlg.
Helminthosporium . . .	--	-	-	0,1021 ± 0,0023
Alternaria . .	-	–		0,1468 ± 0,0036
Penicillium .	-	—		0,1177 ± 0,0147
Ophiobolus .	0,0151 ± 0,0011	0,0542 ± 0,0009	0,0919 ± 0,0020	0,1259 ± 0,0032
Cercosporella .	0,0262 ± 0,0009	0,0675 ± 0,0067	0,1298 ± 0,0005	0,1675 ± 0,0056
Fusarium . .	0,0261 ± 0,0017	0,0686 ± 0,0028	0,1422 ± 0,0067	0,1560 ± 0,0002
Cladosporium .	0,0170 ± 0,0021	0,0414 ± 0,0009	0,0995 ± 0,0006	0,1411 ± 0,0012
Mucor	0,0602 ± 0,0016	0,0959 ± 0,0022	0,1335 ± 0,0053	0,1602 ± 0,0024

Ophiobolus auf den Kontrollösungen.

	50 ccm fr. Nlg.	40 ccm A. d. + 10 ccm fr. Nlg.	25 ccm A. d. + 25 ccm fr. Nlg.	10 ccm A. d. + 40 ccm fr. Nlg.
Kontrollösungen	0,3607 ± 0,0020	0,0548 ± 0,0028	0,1246 ± 0,0051	0,2661 ± 0,0055

[1]) Abkürzungen der Tabelle: 1. Spalte: Nährlösung, vorher bewachsen durch; 2. Spalte: 50 ccm der durch EK-Filter sterilisierten Lösung + 10 ccm frische Nährlösung (die nächsten Spalten dieser entsprechend). A. d. = Aqua dest.

Aus diesen Zahlen sieht man, daß bei den von Helminthosporium, Alternaria und Penicillium vorher bewachsenen Lösungen ein Wachstum von

[1]) In Frage kamen die EK-Lösungen aller Pilze 4 Wochen alt; die Lösung von Cercosporella war 8 Wochen alt.

[2]) 4 Teile EK-Lösung zu 1 Teil frischer Nährlösung; die frische Nährlösung war immer in den sterilen Kolben.

Ophiobolus erst möglich wird bei einem Verhältnis von 10 ccm EK-Filtrat zu 40 ccm frischer Nährlösung. Aber auch hier liegen die Werte für die Myzelgewichte weit unter denen der Kontrollen, so daß wir fraglos annehmen dürfen, daß nicht Nährstoffmangel allein, sondern offensichtlich eine toxische Wirkung des Substrates maßgebend fur die Hemmung von Ophiobolus sein muß.

Die Werte für die Myzelgewichte von Ophiobolus auf den Lösungen, die vorher mit Ophiobolus, Cercosporella, Fusarium, Cladosporium und Mucor bewachsen waren, erscheinen zunächst nicht ganz klar. Wir sehen, daß bei einem geringen Zusatz von frischer Nährlosung zu den EK-Filtraten Ophiobolus fast die Myzelgewichte der Kontrollen erreichen kann, ja daß z. T. die Werte noch etwas hoher liegen.

Bei einem Verhältnis von 10 ccm EK Filtrat zu 40 ccm frischer Nährlösung liegen aber die Werte ganz bedeutend unter denen der Kontrollreihen. Man könnte geneigt sein anzunehmen, daß für die Schwankungen eine toxische Wirkung des Filtrates nicht verantwortlich gemacht werden dürfte; denn die Hemmung ist ja gerade dort am stärksten, wo die geringste Menge des EK-Filtrates vorhanden ist.

Es ist aber folgendes zu bedenken. Die Filtrate dieser Pilze sind für Ophiobolus nicht so giftig, daß sie diesem Pilz ein Wachstum unmöglich machen, sondern, wie aus der ersten Rubrik der Tab. 10 ersichtlich ist, wuchs Ophiobolus uberall an und gab auf allen Losungen noch geringe Erntegewichte.

Betrachten wir nun zunächst das Wachstum von Ophiobolus auf gebrauchten Nährlösungen von Ophiobolus oder Cladosporium, so erkennt man, daß bei einem geringen Zusatz von frischer Nährlösung zum EK-Filtrat nicht die Werte der Kontrollreihen erreicht werden, während man sogar erwarten dürfte, daß diese etwas höher liegen würden, da Ophiobolus hier doch die Möglichkeit hat, auch die Nährstoffe des reinen EK-Filtrates auszunutzen. Diese Differenz der Myzelgewichte zwischen Kontroll- und Versuchsreihen wird um so größer, je besser die Ernährungsbedingungen des Pilzes durch Erhöhung der Nährstoffmenge in den Kontrollreihen werden.

Diese Ergebnisse lassen sich vielleicht mit folgendem Beispiel verständlich machen. Im Institut für Pflanzenkrankheiten in Bonn wurden verschieden ernährte Bohnen, und zwar solche ohne Stickstoff und andere, denen alle Nährstoffe reichlich zur Verfügung standen, mit Thielavia basicola, einem Schwächeparasiten, infiziert. Es ergab sich, daß bei gleich starkem Befall in der Stickstoffmangelreihe zwischen infizierten und nicht infizierten (Kontrollen) Pflanzen kaum bzw. gar keine Ertragsunterschiede vorhanden waren, während in den Reihen, wo die gute Ernährung der Pflanze ein üppiges Wachstum gestattete, ein schwacher Befall durch Thielavia basicola sich in den infizierten Reihen in einem ganz erheblichen Mindereртrag von mindestens 60% gegenüber den Kontrollen auswirkte.

Ebenso wie bei den Filtraten, auf denen Cladosporium und Ophiobolus gewachsen waren, wird auch bei denen von Cercosporella, Fusarium und Mucor die Differenz in den Erntegewichten zwischen Kontroll- und Versuchsreihen um so größer, je besser die Ernährungsbedingungen des Pilzes in der Kontrollreihe sind.

Diese Resultate lassen sich nur mit einer hemmenden Wirkung des Filtrates erklären.

War diese Auffassung richtig, so mußte die Hemmung noch größer werden, wenn günstige Ernährungsbedingungen in der Kontrolle mit günstigen Entwicklungsmöglichkeiten in der Versuchsreihe bei Zusatz einer größeren Menge Filtrat in Vergleich gebracht werden.

Deshalb setzte ich noch folgende Versuchsreihe an: 50 ccm frische Nährlösung wurde mit 50 ccm der EK-Filtrate der untersuchten Pilze gemischt. In der Kontrollreihe trat an Stelle des EK-Filtrates die gleiche Menge Aqua dest. Die Werte für die Myzelgewichte sind in Tab. 11 zusammengestellt.

Tab. 11. Ophiobolus auf gebrauchter Nährlösung.

Nährlösung, vorher bewachsen durch	50 ccm EK-Filtrat und 50 ccm frische Nährlösung
Helminthosporium	—
Alternaria	—
Penicillium	—
Ophiobolus	0,1313 ± 0,0034
Cercosporella	0,1675 ± 0,0017
Fusarium	0,1651 ± 0,0028
Cladosporium	0,1445 ± 0,0027
Mucor	0,1661 ± 0,0029

Ophiobolus auf der Kontrolllösung:

	50 ccm Aqua dest. und 50 ccm frische Nährlösung
Ophiobolus	0,3741 ± 0,0014

Aus den vorliegenden Werten erkennt man, daß Ophiobolus durch die Erhöhung der Nährstoffe in der Versuchsreihe kaum noch sein Erntegewicht gesteigert hat, wodurch — wie erwartet — die Differenz zwischen den Kontroll- und Versuchsreihen entschieden größer geworden ist.

Zusammenfassend war also aus diesen Versuchen abzuleiten, daß die Filtrate von Helminthosporium, Alternaria und Penicillium so toxisch sind für Ophiobolus, daß sie diesem Pilz erst in einer Verdünnung 1 : 4 (10 ccm EK-Filtrat + 40 ccm frische Nährlösung) ein gehemmtes Wachstum gestatten.

Die Filtrate von Ophiobolus, Cercosporella, Fusarium, Cladosporium und Mucor üben ebenfalls eine hemmende Wirkung aus, und zwar ist diese um so stärker, je höher die Nährstoffkonzentration des Mediums ist, dem die EK-Filtrate zugesetzt werden.

3. Wirkung der hemmenden Stoffe auf junge bzw. ältere Pilzkulturen.

Einem weiteren Versuch lag die Fragestellung zugrunde: „Wird die toxische Wirkung auf ein junges Myzel dieselbe sein wie auf eine bereits herangewachsene Pilzkultur?"

In 300 ccm-Kolben, deren Konstruktion aus Abb. 9 ersichtlich ist, wurde Ophiobolus auf 50 ccm Nährlösung geimpft. Die Kolben waren mit einer Marke auf 25 und 50 ccm graduiert. Nach 14tägigem Wachstum wurde die Nährlösung durch den Hahn „a"

bis auf 25 ccm abgelassen, dann mit einem sterilen EK-Filtrat einer 4 Wochen alten Cladosporium-Kultur durch das bis zum Boden des Kolbens reichende Glasrohr „b" wieder auf 50 ccm aufgefüllt. Dieses Verfahren wiederholte ich 8mal, so daß also in den Kolben nur noch 0,078% der Ausgangslösung erhalten war. Praktisch war damit die entwickelte Ophiobolus-Kultur ohne Beschädigung des Myzels auf das sterile EK-Filtrat von Cladosporium übertragen.

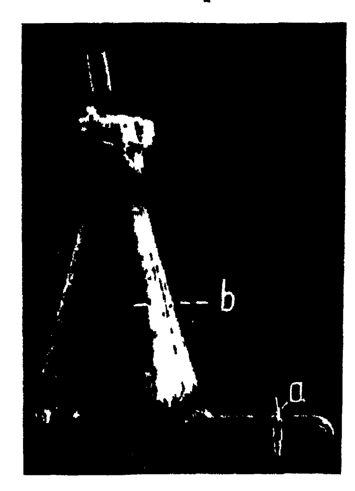


Abb. 9. Kolben zum sterilen Auswechseln der Nährlösung.

Am Tage des Wechsels der Nährlösungen bestimmte ich von den Kontrollkulturen (50 ccm frische Nährlösung) die Myzelgewichte von Ophiobolus, die im Mittel 0,1955 ± 0,0020[1]) betrugen. Nach 14tägigem Verbleiben des Ophiobolus-Myzels auf dem EK-Filtrat der Cladosporium-Kultur (es wurde mit 8 Kontrollen gearbeitet, die Versuche 2mal wiederholt) wurde der Versuch abgebrochen. Das Myzelgewicht der Ophiobolus-Kulturen, die 4 Wochen auf der frischen Weizenextraktlösung gewachsen waren, betrug 0,2608 ± 0,0020 g und derjenigen, die nach 14 Tagen auf das Cladosporium-Filtrat geimpft wurden, war 0,1678 ± 0,0013 g.

Vergleicht man die Werte miteinander, so sieht man, daß das EK-Filtrat von Cladosporium auch bei einer bereits erwachsenen Kultur von Ophiobolus das Myzelwachstum zum Stillstand bringt, ja daß sogar innerhalb von 14 Tagen vielleicht durch Veratmung eine Verminderung des Myzelgewichtes eintritt.

4. Diffusion der hemmenden Stoffe in Agar-Kulturen.

Im Anschluß an die vorliegenden Untersuchungen prüfte ich die Wirkung der EK-Lösungen, auf denen die verschiedenen Pilze herangewachsen waren, auf Agar-Kulturen.

Als Untersuchungsobjekte diente Ophiobolus und Fusarium. Als Filtrat fand nur solches von Penicillium-Kulturen Verwendung. Von 800 ccm Nährlösung, auf der 4 Wochen Penicillium gewachsen war, wurden bei 40° C im Vakuum 700 ccm abdestilliert. Das Destillat und die restliche Flüssigkeit von 100 ccm verwandte ich getrennt, nachdem beide durch EK-Filter entkeimt und in Reagenzgläser steril abgefüllt waren.

Die Versuchsmethodik war folgende: 1proz. Biomalz-Platten (je 30 ccm) wurden nach dem Erkalten halbiert und mit Fusarium beimpft. Hatte die Kultur einen Durchmesser von 40 mm erreicht, wurden 5 ccm des eingedampften Filtrates vorsichtig in die leere Schalenhälfte gebracht, so daß kein Überfließen über die Pilzkultur erfolgte.

Bereits 24 Std. nach dem Eingießen des Filtrates — die Kulturen standen in Thermostaten — zeigten die der Agar-Schnittfläche zunächst liegenden Hyphen eine Hemmung, während die seitlichen und entfernter liegenden Hyphen zunächst noch etwas weiter wuchsen. 6 mm vor der Agar-Schnittfläche kam das Myzelwachstum fast geradlinig unter Bildung eines dichten, zunächst gelben, dann braunen Hyphensaumes zum Stillstand.

Diese Art der Hemmung entspricht also genau den Hemmungsbildern, wie wir sie früher beim Gegeneinanderwachsen von Fusarium- und Penicillium-Kulturen beobachten konnten.

Während dagegen beim Gegeneinanderwachsen zweier lebender Pilzkulturen der Hemmungsraum nie überwunden wird, wuchsen in diesem

---

[1]) Diese Werte für die Myzelgewichte sind niedriger, als sie in Abschnitt C. 2 für Ophiobolus auf 50 ccm Weizenextraktlösung angegeben wurden. Die Abweichungen kommen durch eine veränderte Weizenextraktlösung zustande; es wurde zu diesem Sommerweizen (Strubes Schlanstedter) verwandt.

Versuch nach 6 Tagen aus dem dunkelbraunen Hyphensaum wieder vereinzelte farblose Hyphen aus, die etwa 3 mm geradlinig wuchsen, dann kleine, tiefrote Myzelfächer bildeten. Nach erneuter Hemmung wuchs das Myzel in der gleichen Art weiter. Unter starker Rotfärbung drangen einzelne Hyphen sogar etwas über die Agar-Schnittfläche hinaus. Zu diesem Zeitpunkt hatten sich in einem Sektor, dessen Mittelpunkt das Impfstück und dessen Kreisbogen die primäre Hemmungszone war, zahlreiche Acervuli gebildet.

Die Stärke der Hemmung trat bei einem Vergleich mit den Kontrollkulturen (halbierte 1proz. Biomalzplatten von gleicher Dicke) deutlich in Erscheinung. Hier hatte das Myzel bereits den gegenüberliegenden Schalenrand erreicht, ehe die erste Hemmung in den Versuchsreihen überwunden war.

Noch stärker als gegen Fusarium wirkte das Filtrat auf eine Kultur von Ophiobolus. Nachdem dieser Pilz einen Durchmesser von 40 mm erreicht hatte, goß ich das Filtrat in der gleichen Weise in den leeren Schalenraum.

Bereits nach 24 Std. wurde die Hemmung der ersten Hyphen sichtbar. Durch Weiterwachsen der Seitenhyphen plattet sich die anfangs kreisrunde Kultur ab, ähnlich wie bei Fusarium culmorum. 2 Tage nach dem Eingießen des Filtrates kam das Wachstum von Ophiobolus in einem Abstand von 10 mm von der Agar-Schnittfläche vollständig zum Stillstand. Die Hyphen verfärbten sich dunkelbraun und zeigten bei mikroskopischer Betrachtung neben gelbem Pigment eine starke Anhäufung von Fett.

Diese Hemmung wurde bei Ophiobolus nicht überwunden. Die braun verfärbten Hyphen waren durch das Filtrat aber nicht abgetötet, sondern ein Impfstück aus der braunen Hemmungszone wuchs auf 1proz. Biomalz-Agar wieder mit normalem Myzel aus.

Neben den durch EK-Filter entkeimten Lösungen wurden zu gleichen Versuchen auch Filtrate gleicher Konzentration verwandt, welche durch ½stünd. Erhitzen bei 1,2 Atm. sterilisiert waren.

Die Wirkung dieser Lösungen auf Ophiobolus und Fusarium war die gleiche.

Das Destillat zeigte dagegen gar keine hemmende Wirkung. Wie bei Kontrollversuchen, in denen die andere Schalenhälfte mit Aqua dest. ausgegossen war, wuchsen die Pilze vollkommen radial mit einer dichten Myzeldecke in die Flüssigkeit hinein.

In weiteren Kontrollen, bei denen frische Weizenextraktlösung in die leere Schalenhälfte gebracht wurde, zeigten die Pilze ein besonders üppiges Wachstum, so daß also ein Einwand, der Weizenextrakt selbst könnte eine hemmende Wirkung ausüben, hinfällig ist.

Über den chemischen Charakter dieser Stoffe wurden weitere Untersuchungen bisher noch nicht gemacht. Wir können aber von ihnen aussagen, daß sie durch eine Sterilisation bei 1,2 Atm. nicht zerstört werden, daß sie beim Destillieren im Vakuum bei 40° C nicht in das Destillat übergehen, und daß sie offensichtlich, wie aus ihrer Wirkung ersichtlich ist, schnell in den Agar diffundieren.

5. Bildung der hemmenden Stoffe in Abhängigkeit von der Stickstoffquelle des Substrates.

Zur Untersuchung, ob die Bildung der hemmenden Stoffe abhängig ist von einer bestimmten Stickstoffquelle, dienten Versuche, in denen einer

anorganischen Nährlösung (Stammlösung)[1]) mit Dextrose als Kohlenstoffquelle eine organische oder anorganische Stickstoffverbindung in verschiedenen Quantitäten zugesetzt wurde.

Die Zusätze, die zu 100 ccm der sterilen[2]) Lösungen gegeben wurden, sind in Tab. 11 angegeben.

Alle Versuchsreihen wurden mit Helminthosporium beimpft.

Anzahl der Kontrollen und der Wiederholungen und auch die Kulturbedingungen waren die gleichen wie in den fruheren Versuchen.

Gleichzeitig angesetzte unbeimpfte Kontrollreihen wurden mit den Versuchsreihen für spätere Kulturversuche in den Thermostaten gebracht.

Nach 4 Wochen wurden die Myzelgewichte bestimmt.

Tab. 12. Zusammensetzung und ph-Werte der Kulturlösungen, Myzelgewichte von Helminthosporium und die ph-Werte der gebrauchten Nährlösung.

Nr. der Kulturreihe	Chemische Zusammensetzung der Lösung	ph der Lösung	Myzelgewichte von Helminthosporium	ph-Werte der Lösungen
1	100 ccm Stlg. ohne Zusatz	4,79	nur angewachsen	—
2	100 ccm Stlg. + 0,5 g Pepton	5,02	0,7156 ± 0,0037	6,35
3	100 ccm Stlg. + 1,0 g Pepton	5,37	0,7384 ± 0,0356	7,57
4	100 ccm Stlg. + 1,5 g Pepton	5,67	0,8226 ± 0,0221	7,67
5	100 ccm Stlg. + 2,0 g Pepton	5,99	0,8256 ± 0,2511	7,74
6	100 ccm Stlg. + 2,5 g Pepton	5,13	0,8221 ± 0,2476	7,83
7	100 ccm Stlg. + 0,125 g KNO_3	5,62	0,6984 ± 0,0695	7,24
8	100 ccm Stlg. + 1,0 g KNO_3	5,56	0,7246 ± 0,0876	7,19
9	100 ccm Stlg. + 0,125 g NH_4NO_3	6,20	0,2833 ± 0,2968	2,63
10	100 ccm Stlg. + 1,0 g NH_4NO_3	5,23	0,3527 ± 0,1965	2,65

Die Nährlösungen, auf denen Helminthosporium sich 4 Wochen entwickelt hatte, wurden durch EK-Filter sterilisiert und je 50 ccm (in 300 ccm Erlenmeyer-Kolben) mit Ophiobolus beimpft. Wie die Höhe der mittleren Fehler der Myzelgewichte von Helminthosporium zeigt, bestehen Schwankungen innerhalb der einzelnen Versuchsreihen. Da nun die Möglichkeit besteht, daß der gebildeten Myzelmenge die der Substrat-Gifte proportional ist, wurden zur Erzielung einer einheitlichen Lösung von jeder Versuchsreihe die Flüssigkeiten zusammengegossen und von dieser in jeden Kolben 50 ccm gebracht.

Mit den Kontrollösungen verfuhr ich in gleicher Weise. Wie aus Tab. 12 ersichtlich ist, stimmen die Mittelwerte der Myzelgewichte der Versuchsreihen nicht überein. Eine vollkommene Übereinstimmung ist nur sehr schwer zu erreichen. Darum sind die Kulturreihen untereinander nicht alle vergleichbar.

Die beimpften Kolben wurden im Thermostaten 4 Wochen aufbewahrt und dann Erntegewichts-Bestimmungen gemacht.

Während in den Kontrollreihen, außer in den Versuchsreihen 1, 6 und 10, Ophiobolus allgemein ein mehr oder weniger dichtes Myzel bildete, zeigte dieser Pilz niemals auch nur das geringste Wachstum auf einer Nährlösung, die vorher von Helminthosporium bewachsen war. Die Veränderung des ph-Wertes kann höchstens in Reihe 9 die Ursache der Hemmung von Ophiobolus sein.

Die übrigen Kulturreihen zeigen eine Azidität, bei der nach Schaffnit und Meyer-Hermann (60) das optimale Wachstum von Ophiobolus liegt. Trotzdem erfolgt nicht einmal ein Anwachsen des Impfstückes.

Wäre Nährstoffmangel die alleinige Ursache der Hemmung, so müßte wenigstens ein Anwachsen und eine schwache Myzelbildung erfolgen. In

[1]) 0,6 g $MgSO_4$, 1,0 g KH_2PO_4 und 30,0 g Dextrose auf 1000 ccm Aqua dest.

[2]) Sterilisation: ½ Std. bei 1,2 Atm.

den meisten Fällen zeigten auch in den klaren anorganischen Nährlösungen die Myzelstücke deutliche Verfärbung, die auf eine Schädigung schließen läßt.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß die Bildung der hemmenden Stoffe nicht nur auf organischen Nährlösungen, sondern auch auf Kulturlösungen mit anorganischer Stickstoffquelle erfolgen kann.

6. Verhalten der hemmenden Stoffe bei der Hitzesterilisation.

Müssen wir annehmen, daß eine toxisch wirkende Substanz die Ursache für das schlechte Wachstum von Ophiobolus auf den Filtraten der Pilze war, so wurde in einem weiteren Versuch geprüft, ob durch die Hitzesterilisation[1]) die hemmenden Stoffe zerstört werden[2]) oder ob sie in ihrer Wirkung erhalten bleiben. Das Wachstum von Ophiobolus auf den durch Hitze sterilisierten gebrauchten Nährlösungen dieser Pilze[3]) war das gleiche wie auf den EK-Filtraten.

Der besseren Übersicht wegen werden die Mittelwerte neben denen fur die Myzelgewichte auf dem EK-Filtrat in Tab. 12 zusammengestellt.

Tab. 13. Ophiobolus auf gebrauchter Nährlosung.

Nahrlosung, vorher bewachsen durch	50 ccm Filtrat sterilisiert	50 ccm EK-Filtrat
Helminthosporium . . .	—	—
Alternaria	—	—
Penicillium	—	—
Ophiobolus	0,0328 ± 0,0024	0,0151 ± 0,0011
Cercosporella	0,0399 ± 0,0008	0,0262 ± 0,0009
Cladosporium	0,0232 ± 0,0015	0,0170 ± 0,0021
Mucor	0,0645 ± 0,0028	0,0602 ± 0,0016
Fusarium	0,0375 ± 0,0038	0,0261 ± 0,0017

Die Zahlen der Tabelle zeigen, daß eine Sterilisation in der Hitze die Wirkung der Nährlösung prinzipiell nicht verändert. Wenn auf den Filtraten, die durch Hitze sterilisiert waren, allgemein höhere Myzelgewichte geerntet wurden, so wird diese geringe Erhöhung natürlich auf einer Veränderung der Nährstoffe durch die Hitzesterilisation beruhen.

Zusammenfassung der Ergebnisse vom I. Teil.

Beim Gegeneinanderwachsen zweier Myzelien auf Agarplatten, gleichgültig, ob es sich um Pilze verschiedener oder gleicher Art handelt, kann eine deutliche Hemmung auftreten. Diese Hemmung ist charakterisiert:

1. durch vollständigen oder vorübergehenden Wachstumsstillstand eines Pilzes, oft schon in einer bestimmten Entfernung von dem entgegenwachsenden Myzel;
2. durch die Abnahme der Myzeldichte;
3. durch die Zunahme der Myzeldichte vor der Hemmungszone;
4. durch Ausbildung eines typischen Hemmungsraumes;
5. durch anomale Pigmentbildung;

[1]) Sterilisiert wurde ½ Std. lang bei 1,2 Atm.

[2]) Eine derartige Beeinflussung durch die Hitzesterilisation berichten: Boyle (9), Lutz (38), Satoh (58).

[3]) Es wurden 50 ccm Nahrlosung verwandt.

6. durch verminderte Sporenausbildung in der Hemmungszone bei Pilzen, die normalerweise lebhaft fruktifizieren, oder durch vermehrte Ausbildung von Fruchtlagern bei Pilzen, die diese unter normalen Bedingungen nur in geringer Zahl erzeugen.

Das Hemmungsbild kann erhalten bleiben oder überwunden werden. In seltenen Fällen erfolgt ein stark gehemmtes Überwachsen des Nachbarmyzels.

Das Verhalten der Hyphen im Substrat bei der Berührung des entgegenwachsenden Myzels kann verschieden sein:

1. Es kann in einer geringen Breite in der Zone des ersten Aufeinandertreffens der beiden Myzelien eine ungeregelte Mischung der peripheren Hyphen erfolgen.

2. Das Myzelwachstum kann in allen Teilen des Substrates ohne besondere Veränderungen der Hyphen in einer für jede Pilzart charakteristischen Entfernung zum Stillstand kommen.

3. Die Hyphen können in den unteren Teil des Substrates abgelenkt werden.

4. Die Hyphendichte kann in der Hemmungszone sehr stark zunehmen bzw. abnehmen.

Nährstoffmangel allein kann nicht die Ursache der gegenseitigen Wachstumshemmung der Pilze sein, da

1. bei gleicher Schichtdicke, aber veränderter Nährstoffmenge der höheren Konzentration der breitere Hemmungsraum entspricht;

2. auf nährstofffreiem Agar die Hemmungsraumbildung aufgehoben werden kann;

3. die Pilze, wenn sie aus nährstoffreichem Medium kommen, vollkommen radial ohne die typischen Hemmungserscheinungen in das nährstofffreie Substrat oder sogar in den leeren Schalenraum wachsen können.

Nach den Ergebnissen der Flüssigkeitskulturen reichen die durch das Pilzwachstum verursachten Aziditätsänderungen für eine Erklärung der Hemmungserscheinungen nicht aus.

Gerade nach diesen Resultaten wird auch Nährstoffmangel als alleinige Ursache der gegenseitigen Hemmung sehr unwahrscheinlich. Es muß vielmehr angenommen werden, daß durch die Entwicklung der Pilze in das Nährsubstrat Stoffe ausgeschieden werden, die auf diesen Pilz selbst bzw. auf andere Pilze mehr oder weniger toxisch wirken.

Die hemmende Wirkung ist um so größer, je besser die Lebensbedingungen der Pilze durch hohen Nährstoffgehalt des Kulturmediums sind.

Die hemmenden Stoffe sind thermostabil, gehen beim Destillieren bei 40° C nicht in das Destillat über und diffundieren sehr schnell in den Agar. Ihre Ausbildung ist unabhängig von der Stickstoffquelle der Nährlösung.

Dieselbe hemmende Wirkung, die eine lebende Penicillium-Kultur auf ein entgegenwachsendes Fusarium- oder Ophiobolus-Myzel ausübt, zeigt auch die 4 Wochen alte Nährlösung von Penicillium gegenüber den genannten Pilzen.

Ophiobolus graminis Sacc. wird in Agarkulturen am stärksten gehemmt durch Helminthosporium sativum und Penicillium sp.

Weniger stark wird dieser Parasit bei diesen Kulturbedingungen durch Alternaria sp., Fusarium culmorum und Mucor sp. in seiner Entwicklung beeinflußt, während durch eine entgegenwachsende

Cladosporium- oder Cercosporella-Kultur bei Ophiobolus graminis Sacc. nur die Myzeldichte in der Berührungszone etwas abnimmt.

In den Flüssigkeitskulturen liegen die Verhältnisse ähnlich. Hier übt aber auch Alternaria sp. neben Helminthosporium sativum und Penicillium sp. eine sehr starke hemmende Wirkung aus, während die übrigen Pilze, Cladosporium herbarum Link, Cercosporella herpotrichoides de Not, Ophiobolus graminis Sacc. und Mucor sp., weniger stark die Entwicklung von Ophiobolus graminis Sacc. hemmen können.

II. Teil.

Die Bedeutung der Pilzkonkurrenz im Boden für die Anfälligkeit von Weizen gegenüber Ophiobolus graminis Sacc.

In dem zweiten Hauptteil der Arbeit sollte untersucht werden, wieweit durch die wechselseitige Beeinflussung verschiedener Pilze die Agressivität von Ophiobolus auf die lebende Pflanze beeinträchtigt werden kann. Man konnte annehmen, daß die Pilze, die diesen Parasiten in der Kultur stark hemmten, auch im Boden sein Wachstum beeinflußten und infolgedessen die Pflanze vor Befall schützen könnten. Derartige Untersuchungen wurden von Sandford und Broadfoot (57) mit positivem Ergebnis gemacht. Blunck und Moritz (74) stellten auf Grund ähnlich gerichteter Versuche ihre Theorie von der „biologischen Pufferung“ des Bodens auf.

Tab. 14. Versuchsreihen und Infektionszeiten.

Kultur-Nr.	Am 2. April in den Boden gebracht wurden	Am 2. Mai in den Boden gebracht wurden
1—5	—	Kontrolle: sterilisiertes Stroh
6—10	—	Ophiobolus (allein)
11—15	—	Helminthosporium (allein)
16—20	—	Ophiobolus + Helminthosp.
21—25	Ophiobolus	Helminthosporium
26—30	Helminthosporium	Ophiobolus
31—35	-	Alternaria
36—40		Ophiobolus + Alternaria
41—45	Ophiobolus	Alternaria
46—50	Alternaria	Ophiobolus
51—55		Cladosporium
56—60		Ophiobolus + Cladosporium
61—65	Ophiobolus	Cladosporium
66—70	Cladosporium	Ophiobolus
71—75	--	Penicillium
76—80	—	Ophiobolus + Penicillium
81—85	Ophiobolus	Penicillium
86—90	Penicillium	Ophiobolus
91—95	—	Mucor
96—100	—	Ophiobolus + Mucor
101—105	Ophiobolus	Mucor
106—110	Mucor	Ophiobolus

Die Anlage unserer Versuche ist weiter unten beschrieben. Da der Schutz durch einen das Wachstum von Ophiobolus hemmenden Pilz um so

größer sein muß, je stärker er bereits im Boden zur Entwicklung gekommen ist, so wurde den einzelnen in jeder Versuchsreihe verwandten Pilzen ein Entwicklungsvorsprung von 4 Wochen gelassen, ehe der zweite Pilz in die Kulturgefäße gebracht wurde. Daneben mischte ich in anderen Versuchen zwei Pilze zu gleicher Zeit in den Boden, prüfte aber stets auch die Agressivität eines jeden Pilzes allein auf die Pflanze. Die Zeiten, in denen das Infektionsmaterial dem Boden zugesetzt wurde, und die verschiedenen Versuchsreihen sind in Tab. 14 angegeben.

Wie aus Tab. 14 ersichtlich ist, prüfte ich Helminthosporium, Alternaria, Cladosporium, Penicillium und Mucor immer in Verbindung mit Ophiobolus. Ich setzte folgende Versuchsreihen an:

1. Alle Pilze wurden je allein in den Boden gebracht;
2. Ophiobolus wurde mit den einzelnen Pilzen zusammen dem Boden zugesetzt;
3. Ophiobolus hatte einen Entwicklungsvorsprung von 4 Wochen, ehe der zweite Pilz in die Kulturgefäße gemischt wurde;
4. die einzelnen Pilze hatten sich 4 Wochen im Boden entwickelt, ehe mit Ophiobolus infiziert wurde;
5. zur Kontrolle wurde sterilisiertes Stroh in den Boden gebracht.

Zu allen Versuchen verwandte ich Tontopfe mit einem oberen Durchmesser von 20 cm, die mit 3,5 kg Sand-Torf-Gemisch[1]), dem eine ausreichende Grunddüngung[2]) zugesetzt war, beschickt wurden.

In jedes Kulturgefäß mischte ich in gleicher Tiefe[3]) 70 g gut von den Pilzen durchwachsenen Hacksel. Alter der Kulturen war 4 Wochen.

Nach dem Einbringen des letzten Infektionsmaterials besäte ich alle Topfe gleichmäßig mit je 11 Weizenkörnern der Sorte „Heines Kolben"[4]).

Der Auflauf erfolgte gleichmäßig in allen Reihen nach 8 Tagen. Nur in einzelnen Gefaßen, die Infektionsmaterial von Ophiobolus enthielten, fielen einige Pflanzen aus.

Die ersten Unterschiede machten sich bemerkbar bei der Bestockung der Pflanzen, die einheitlich 19 Tage nach der Aussaat erfolgte. Die Versuchsreihen, in denen Helminthosporium, Alternaria, Cladosporium, Penicillium und Mucor oder auch Ophiobolus einen Entwicklungsvorsprung von 4 Wochen gegenuber dem zweiten Pilz hatten, wiesen die geringste Bestockung auf. Nach 10 Wochen schoßten die Pflanzen einheitlich. Zu dieser Zeit konnte ich die ersten deutlichen Großenunterschiede konstatieren, die sich mit zunehmendem Alter der Pflanzen immer mehr veschärften.

Ungefahr 2 Monate nach der Aussaat, zur Zeit der Gelbreife, wurden alle Versuchsreihen ausgewertet. Als Kriterium für das Ausmaß der Schadigung galten:

1. die Halmlänge[5]) (cm),
2. das Strohgewicht (g),
3. das Korngewicht (g),
4. das Tausendkorngewicht (g).

Tab. 14 gibt zahlenmäßig Auskunft uber die Verschiedenheiten in den Kulturreihen.

In allen Versuchsreihen kann man übereinstimmend feststellen, daß der Schaden für Ophiobolus[6]), sowohl beurteilt nach der Halmlänge, nach dem Stroh-, Korn- oder Tausendkorngewicht, in den Reihen am größten ist, in denen die Pilze Helminthosporium, Alternaria, Penicillium, Cladosporium und Mucor sich 4 Wochen im Boden entwickeln konnten, ehe Ophiobolus zugesetzt wurde.

---

[1]) 6% Torf. Das Gemisch wurde 2 Std. bei 1,8 Atm. sterilisiert.

[2]) Auf jeden Topf 1 g NH_4NO_3, 0,3 g KCl und 0,3 g $CH_4(PO_4)_2$.

[3]) 1 kg Sand-Torf-Gemisch wurde aus den Topfen genommen. Nachdem das Infektionsmaterial dem Boden beigemischt war, wurde dieses wieder daruber gedeckt.

[4]) Es wurden 5 Kontrollen von jeder Reihe angesetzt, also 55 Pflanzen. Die Kulturen wurden im Freien aufbewahrt.

[5]) Die in den Tabellen angegebenen Werte fur die Halmlängen sind Mittelwerte von 55 Bestimmungen. Die anderen Werte der Tabellen sind Einzelbestimmungen für eine ganze Versuchsreihe.

[6]) In allen Versuchsreihen, die mit Ophiobolus infiziert waren, fand sich Myzel dieses Pilzes in der Wurzel, das zuruckisoliert werden konnte.

Es folgen dann in der Stärke der Schädigung die Kulturen, in denen Ophiobolus den gleichen Entwicklungsvorsprung hatte.

Die nächstgrößte Ertragsverminderung, gewertet nach der Halmlänge, dem Stroh- oder Korngewicht, zeigen die Kulturen, in denen Ophiobolus allein dem Boden beigemischt wurde, während der Schaden etwas geringer ist, wenn man beide Pilze zu gleicher Zeit in den Boden mischt.

Tab. 15. Ophiobolus mit anderen Pilzen.
Halmlänge, Stroh-, Korn- und Tausendkorngewichte.

Versuchsreihen	Halmlange cm	Strohgewicht g	Korngewicht g	Tausend-Korngewicht g
Kontrolle (Stroh)	77,81 ± 1,13	60,08	35,4073	34,75
Cladosporium (allein)	72,81 ± 1,38	60,04	35,4030	32,42
Ophiobolus und Cladosporium	74,70 ± 0,78	60,04	34,7843	31,47
Ophiobolus (allein)	71,42 ± 1,26	60,04	32,1417	31,96
Ophiobolus (4 Wo.) und Cladosporium	59,41 ± 1,50	48,02	29,6247	31,31
Cladosporium (4 Wo.) und Ophiobolus	55,73 ± 1,61	40,06	21,2119	26,95
Helminthosporium (allein)	77,13 ± 1,03	60,07	35,3710	34,22
Ophiobolus und Helminthosp.	71,70 ± 1,67	60,05	32,2002	33,89
Ophiobolus (4 Wo.) und Helminthosporium	70,93 ± 1,08	60,00	28,4860	31,85
Helminthosporium (4 Wo.) und Ophiobolus	65,44 ± 1,45	50,06	25,4448	31,84
Penicillium (allein)	74,14 ± 1,18	60,08	34,4370	34,64
Ophiobolus und Penicillium	71,89 ± 1,52	60,07	34,8292	32,39
Ophiobolus (4 Wo.) und Penicillium	62,39 ± 1,41	50,06	27,9734	31,18
Penicillium (4 Wo.) und Ophiobolus	56,74 ± 1,00	30,08	18,3222	27,66
Alternaria (allein)	77,01 ± 1,02	60,08	35,3705	34,06
Ophiobolus und Alternaria	72,06 ± 1,37	60,04	34,5695	31,34
Ophiobolus (4 Wo.) und Alternaria	68,35 ± 1,02	50,04	32,4088	31,05
Alternaria (4 Wo.) und Ophiobolus	62,68 ± 1,55	50,00	27,4510	30,05
Mucor (allein)	74,32 ± 1,36	60,06	34,6411	31,87
Ophiobolus und Mucor	71,85 ± 1,34	60,02	34,8743	31,44
Ophiobolus (4 Wo.) und Mucor	71,65 ± 1,14	50,04	29,2625	29,14
Mucor (4 Wo.) und Penicillium	69,28 ± 0,96	50,02	29,0455	28,00

Vergleicht man die beiden letztgenannten Kulturreihen nach dem besten Kriterium, dem Tausendkorngewicht, so erkennt man, daß hier der Schaden nicht für alle Pilze einheitlich ist. Für Helminthosporium und Penicillium — das sind die beiden Pilze, die auch in der Kultur die stärkste Hemmung von Ophiobolus verursachen — ist der Schaden geringer, wenn sie zusammen mit Ophiobolus dem Boden zugesetzt werden, als wenn Ophiobolus allein im Boden vorhanden ist und sich ungehemmt entwickeln kann.

Man könnte hier den Einwand machen, daß in den Mischkulturen weniger Infektionsmaterial von Ophiobolus vorhanden ist als in den anderen Reihen.

Wir wissen aber aus Infektionsversuchen im Institut für Pflanzenkrankheiten in Bonn, daß ganz geringe Mengen Infektionsmaterial genügen, um eine starke Schädigung der Weizenpflanze durch Ophiobolus hervor-

zurufen, wenn nur für diesen Pilz günstige Entwicklungs- und Angriffsmöglichkeiten vorhanden sind.

Daß Ophiobolus in hinreichender Menge im Boden vorhanden ist, zeigen auch die Versuchsreihen mit Alternaria, Cladosporium und Mucor. Diese Pilze können die Aggressivität von Ophiobolus nicht herabsetzen, sondern diese wird sogar gesteigert, der Schaden wird also größer.

In den Mischkulturen, in denen Ophiobolus zu gleicher Zeit mit Penicillium und Helminthosporium dem Boden zugesetzt wurde, macht sich aber die stark hemmende Wirkung der letztgenannten Pilze auf diesen Parasiten bemerkbar.

Helminthosporium, Alternaria und Mucor, allein in den Boden gebracht, vermochten die Weizenpflanze nicht zu schädigen[1]).

Durch die Einwirkung von Penicillium und Cladosporium waren kleine Längen- und Gewichtsdifferenzen, verglichen mit der Kontrolle, zu bemerken.

Zur Erklärung der Ergebnisse dieser Kulturreihen ist folgendes zu bedenken: Aus zahlreichen Versuchen am hiesigen Institut, ferner aus den Arbeiten von Blunck und Moritz sowie aus vielen Beobachtungen der Praxis ist bekannt, daß Ophiobolus fraglos auch die gesunde Pflanze befällt, daß aber die Verbreitung dieses Parasiten in der Wurzel und damit das Ausmaß der Schädigung um so größer ist, je ungunstiger die Entwicklungsbedingungen fur die Pflanze selbst sind. Ophiobolus kann starke Schäden an Pflanzen hervorrufen, die z. B. unter stauender Nässe, Sauerstoffmangel, großen Schwankungen in der Wasserversorgung zu leiden haben und deshalb nur ein kümmerliches Wurzelsystem ausbilden können.

Die geringere oder größere Schädigung der Pflanze in den Versuchsreihen, in denen Ophiobolus mit den anderen Pilzen für die Infektionsversuche Verwendung fand, kann nun einmal beruhen auf einer Entwicklungshemmung dieses Parasiten, hervorgerufen durch die mit ihm in den Boden gebrachten Pilze, oder aber darauf, daß eine, wenn auch geringe Schädigung der Pflanze durch die einzelnen Pilze die Angriffsmöglichkeit für Ophiobolus erhöht. Die Tatsache, daß in diesen Versuchen die Schädigung durch Ophiobolus immer am größten ist, wenn der andere Pilz einen Entwicklungsvorsprung von 4 Wochen hat, legt die Vermutung nahe, daß durch den primären Pilz bei der Pflanze eine Schädigung des Wurzelsystems erfolgt, wodurch für Ophiobolus das Eindringen und damit eine Schädigung der Wurzel erleichtert wird.

Tatsächlich zeigen in allen Versuchsreihen, in denen Helminthosporium, Alternaria, Penicillium, Cladosporium oder Mucor allein dem Boden zugesetzt wurde, die Wurzeln deutlich Schädigung[2]), kenntlich an der kümmerlichen Entwicklung des Wurzelsystems und an Bräunungen.

Wie die mikroskopische Untersuchung ergab, findet sich in den mit Cladosporium infizierten Pflanzen auch stets Myzel dieses Pilzes in der Rinde der Wurzel (durch Rückisolation identifiziert).

In der Penicillium-Reihe war allgemein eine Schädigung des Zentral-Zylinders zu sehen, kenntlich an braunen Verfärbungen der Gefäße und später auch der angrenzenden Gewebe, ohne daß hier jemals Myzel in der

[1]) Bewertet nach der Halmlänge, dem Stroh, Korn und Tausendkorngewicht.
[2]) Wenn diese auch in den meisten Fällen sich nicht gewichtsmäßig festlegen ließen.

Wurzel feststellbar war. Offensichtlich wirken die Ausscheidungsprodukte dieses Pilzes schädigend auf die Pflanzenwurzel.

Daß tatsächlich die stark verdünnten wässerigen Auszüge von auf Stroh gewachsenen Penicillium-Kulturen genügen, um große Schädigungen der Pflanzenwurzel hervorzurufen, zeigt folgender Versuch:

200 g einer Strohkultur von Penicillium wurden mit 2500 ccm Aqua dest. bei Zimmertemperatur ausgezogen (24 Std.). 250 ccm dieses stark verdünnten filtrierten Extraktes setzte ich im Vergleich zu der gleichen Quantität Aqua dest. 750 ccm einer Pfefferschen Nährlösung zu.

Daneben wurden Wasserkulturen ohne Zusatz des Penicillium-Auszuges und solche mit Zusatz von 250 ccm eines wässerigen Strohauszuges zur Kontrolle angesetzt. Jede Reihe umfaßte 8 Kulturgefäße.

In die Nährflüssigkeit setzte ich gleichmäßig entwickelte Weizenkeimlinge von 12 cm Länge.

Die Kulturen standen im Freien, also unter annähernd natürlichen Bedingungen.

Während das Wurzelsystem und auch der junge Sproß sich in den Kontrolllösungen von Anfang an üppig entwickelten, zeigten die Wurzeln in den Lösungen mit Extraktzusatz in den ersten 5 Tagen einen vollständigen Wachstumsstillstand. Nach dieser Zeit wurden zwar vom Wurzelhals aus einige kümmerliche Wurzeln gebildet. Die mit der jungen Pflanze in die Nährlösung gebrachten Wurzeln bildeten überhaupt keine Seitenwurzeln aus, während diese in den Kontrollreihen reichlich zur Ausbildung kamen.

Auch der oberirdische Sproßteil zeigte deutliche Zeichen der Schädigung. Die Blätter waren schlaff, und die Blattspitzen gelb. Diese Unterschiede in den Kontroll- und Versuchsreihen waren schon nach 8 Tagen sehr deutlich, wie aus Abb. 10 hervorgeht.

Diese deutlichen Unterschiede blieben auch in der späteren Entwicklung der Pflanze erhalten. Die Bestockung des Sprosses war infolge der hemmenden Wirkung des Extraktes bei weitem nicht so gut wie in der Kontrolle.

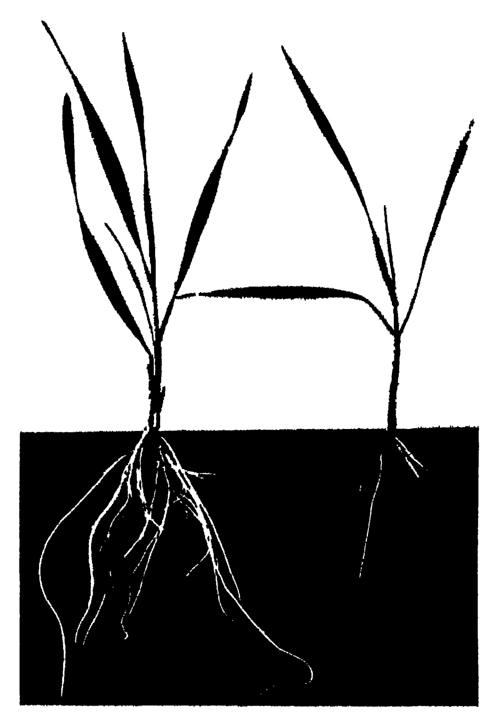


Abb. 10. Wirkung des Penicillium-Extraktes auf Weizenpflanzen.

Das mikroskopische Bild der Wurzeln zeigte die gleiche Schädigung wie in den Vegetationsversuchen, in denen Penicillium in den Boden gebracht wurde. Der Zentral-Zylinder, insbesondere die peripheren Gefäße, zeigten starke Verfärbungen.

Wir müssen also annehmen, daß durch größere Mengen von Penicillium im Boden, wahrscheinlich auch von Helminthosporium, Cladosporium, Alternaria und Mucor, Schädigungen der Wurzel herbeigeführt werden, die dann die Ursache für den stärkeren Schaden durch Ophiobolus darstellen. Diese Verhältnisse sind besonders gegeben in den Kulturreihen, in denen den einzelnen Pilzen ein Entwicklungsvorsprung von 4 Wochen gegenüber Ophiobolus gelassen wurde.

Daß aber auch eine Hemmung von Ophiobolus im Boden erfolgt, die sich in einer Verminderung des Schadens auswirken kann, zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sandford und Broadfoot (57)

die Ergebnisse mit den Mischkulturen, in denen Helminthosporium und Penicillium erst kurz vor der Aussaat zu gleicher Zeit mit Ophiobolus dem Boden beigemischt wurden.

Es ist nun verständlich, daß in den Versuchen, in denen Ophiobolus 4 Wochen eher in den Boden gebracht war und hier sich stark entwickeln konnte, ehe der zweite Pilz in die Kulturgefäße kam, der seinerseits schwach schädigend auf die Wurzel wirkt, größere Schäden auftreten als bei einer Infektion mit Ophiobolus allein. Die in den Tabellen angegebenen Zahlen zeigen übereinstimmend dieses Resultat.

Aus den Ergebnissen des Infektionsversuches läßt sich also folgendes ableiten: Die in den Agar- und Flüssigkeitskulturen fur Ophiobolus beobachteten Hemmungen durch andere Pilze machen sich auch im Infektionsversuch mit Mischkulturen, die zu gleicher Zeit dem Boden zugesetzt werden, in einer Verminderung des Schadens bemerkbar gegenüber den mit Ophiobolus allein infizierten Kulturreihen.

Diejenigen Pilze aber, die auch in Agar- und Flüssigkeitskulturen nur schwach schädigend wirken, erhöhen wahrscheinlich durch ihre Ausscheidungsprodukte, die die Pflanzenwurzel in ihrer Entwicklung hemmen, den Schaden durch Ophiobolus.

Da die das Wachstum von Ophiobolus hemmenden Pilze gleichzeitig auch die Ausbildung des Wurzelsystems der Weizenpflanzen ungünstig beeinflussen, dieser Umstand aber wesentlich ist für die bessere Angriffsmöglichkeit von Ophiobolus, so wird die Hemmung dieses Pilzes durch andere Organismen in den Fällen verdeckt, in denen durch eine besonders starke Verbreitung der Pilze im Boden starke Wurzelschädigungen durch diese ausgelöst werden.

Für die Anfälligkeit von Weizen gegenüber Ophiobolus ist also zu sagen, daß die Gefahr einer Schädigung um so größer ist, je schlechter das Wurzelsystem der Pflanze durch ungünstige Entwicklungsbedingungen, in unserem Falle durch die hemmenden Stoffe der Pilze, ausgebildet ist.

Bei gleich ungünstigen Entwicklungsmöglichkeiten für die Pflanzenwurzel ist das Ausmaß der Schädigung um so größer, je mehr Ophiobolus-Myzel im Boden vorhanden ist.

Festzuhalten ist aber, gerade nach den Ergebnissen dieses Versuches, an der bekannten Erfahrung der Praxis, daß zur Einschränkung hoher Schäden durch Ophiobolus die Vermeidung aller der Umstände, die die Bildung eines gesunden, kräftigen Wurzelsystems beeinträchtigen, wichtiger ist als eine Verminderung des Ophiobolus-Myzels im Boden.

Es ist natürlich, daß die im Sand-Torf-Gemisch besonders prägnanten Unterschiede, die uns den Einblick in die Zusammenhänge der wechselseitigen Beeinflussung der Pilze untereinander und die Auswirkung dieses Konkurrenzkampfes auf die Anfälligkeit der Weizenpflanze gegenüber Ophiobolus ermöglichte, in natürlichen Kulturböden weniger stark in Erscheinung treten, da hier durch die Bodenkolloide die durch das Pilzwachstum entstehenden schädigenden Substanzen weitgehend adsorbiert werden. Auf der Adsorption dieser die Wurzelentwicklung schädigenden Stoffe dürfte auch wohl die Verminderung des Schadens durch Ophiobolus bei einem Zusatz von Kaolin oder aktivierter Kohle zum Sand-Torf-Gemisch des Vegetationsversuches beruhen (Moritz 74).

Zusammenfassung der Ergebnisse vom II. Teil.

Im Vegetationsversuch wurde festgestellt, wie weit die Entwicklung von Ophiobolus graminis Sacc. im Boden und der durch diesen Parasiten an Weizenpflanzen verursachte Schaden durch die Konkurrenz von Helminthosporium sativum, Alternaria sp., Cladosporium herbarum Link, Penicillium sp. und Mucor sp. beeinflußt werden kann.

Hierbei ergab sich, daß der Schaden an Weizen durch Ophiobolus graminis Sacc. stets am größten ist, wenn die untersuchten Pilze einen 4wöchigen Wachstumsvorsprung vor Ophiobolus graminis Sacc. haben.

Besonders Cladosporium herbarum Link in Verbindung mit Ophiobolus graminis Sacc. zeigte die stärksten Schadbilder.

Die Erklärung für diese Ergebnisse muß darin gesehen werden, daß durch das Wachstum der obengenannten Pilze Stoffe gebildet werden, die die Wurzeln der Weizenpflanze stark schädigen und dadurch deren Anfälligkeit für Ophiobolus graminis Sacc. erhöhen.

Durch besondere Versuche konnte das Vorhandensein derartiger wurzelschädigender Substanzen erwiesen werden.

Diese Schwächung der Wurzel durch andere Pilze ist stets für das Ausmaß des durch Ophiobolus graminis Sacc. verursachten Schadens wesentlicher als die Hemmung, die dieser Parasit durch andere Pilze erfährt.

Ist die Wurzelschädigung in den Versuchsreihen gleich, so erhöht sich das Schadausmaß immer mit der Menge des im Boden vorhandenen Ophiobolus-Myzels.

Wurden die obengenannten Pilze gleichzeitig mit Ophiobolus graminis Sacc. in den Boden gemischt, so wurde bei den Pilzen, die eine relativ geringe bzw. keine Schädigung von Ophiobolus graminis Sacc. in Agarkulturen hervorrufen, wie z. B. Alternaria sp., Cladosporium herbarum Link und Mucor sp., der Schaden durch Ophiobolus graminis Sacc. stets erhöht gegenüber den Kulturreihen, in denen Ophiobolus graminis Sacc. allein dem Boden zugesetzt war.

Die größten Schäden verursachte auch bei dieser Versuchsanordnung Cladosporium herbarum Link in Verbindung mit Ophiobolus graminis Sacc.

Dieser Pilz beeinflußt in der Kultur das Wachstum von Ophiobolus graminis Sacc. am wenigsten, kann aber die Pflanzenwurzel befallen, empfindlich schädigen und dadurch günstige Angriffsmöglichkeiten für Ophiobolus graminis Sacc. schaffen. Ein starkes Vorhandensein von Cladosporium herbarum Link wird daher die Gefahr eines Ertragschadens durch Ophiobolus graminis Sacc. immer erhöhen.

Die Tatsache der vielfachen Vergesellschaftung von Cladosporium herbarum Link und Ophiobolus graminis Sacc., die so häufig ist, daß ein Cladosporium-Befall der Weizenpflanze geradezu charakteristisch ist für eine Ophiobolus-Infektion, findet durch die Untersuchungen eine annehmbare Erklärung.

Bei einer gleichzeitigen Infektion von Ophiobolus graminis Sacc. mit Helminthosporium sativum und Penicillium

sp., also den Pilzen, die in der Kultur die stärkste Hemmung von Ophiobolus graminis Sacc. hervorrufen, war das Ausmaß des Schadens, gewertet nach dem Tausendkorngewicht, geringer als bei einer Infektion mit Ophiobolus graminis Sacc. allein.

Der Befund, daß durch das Wachstum saprophytischer Pilze gebildete Stoffe die Wurzel schwächen und dadurch ihre Anfälligkeit für Ophiobolus graminis Sacc. erhöhen, gibt weitgehende Aufklärung über die aus der Praxis und auch aus Vegetationsversuchen bekannte Tatsache, daß die Gefahr einer Schädigung durch Ophiobolus graminis Sacc. am größten auf leichten Böden mit geringen adsorptiven Kräften ist. Wir dürfen mit Recht annehmen, daß die wurzelschädigenden Substanzen, die durch das Wachstum saprophytischer Pilze entstehen, in grob dispersen Böden viel gefährlicher sind als in Böden, die durch ihren hohen Zeolitgehalt diese Stoffe weitgehend zu binden vermögen.

Es wird dadurch verständlich, daß Zusätze von Ton oder aktivierter Kohle im Sandboden den Schaden durch Ophiobolus graminis Sacc. verringern können, daß dagegen eine gleich instruktive Wirkung auf schweren Böden nicht erfolgt.

Vorliegende Dissertation wurde am Institut fur Pflanzenkrankheiten der Landwirtschaftlichen Hochschule Bonn-Poppelsdorf ausgefuhrt. Für die zahlreichen Anregungen und die freundlich gewährte Hilfe möchte ich Herrn Privatdozenten Dr. Volk an dieser Stelle meinen Dank aussprechen.

Literatur.

1. Appel, O., Fusarium als Erreger von Fußkrankheiten des Getreides. (Mitt. d. Kais. Biol. Anst. Heft 4. 1907.) — 2. Attanasoff, D., Fusarium Blight of Wheat and other Cereals. (Journ. of Agr. Res. XX. 1920.) — 3. Attanasoff, D., The Fusarium Disease of Cereals. Report of the international Conference of Phytopathology and economic Entomology. Holland 1923. — 4. Bamberg, R. H., A. bacterium antibiotic to Ustilago Zeae. (Phytopathology. 1930.) — 5. Boas, Fr., Zur Kenntnis des Rußtaues der Johannisbeere und verwandter Erscheinungen. (Ztschr. f. Pflanzenkrankheiten. Bd. 27. 1918.) — 6. Boas, Fr., Ann. Mycol. Vol. XVI. 1918. — 7. Boas, Fr., Über Pilzkolonien mit spiraligem Wachstum. (Zentralbl. f. Bakt. Bd. 49. 1919.) — 8. Bockmann, Schwärzepilze des Getreides unter besonderer Berücksichtigung ihrer Pathogenität und das Vorkommen von Rassen innerhalb der Gattungen Cladosporium herbarum Link und Alternaria Nees. (Angew. Bot. 1933.) — 9. Boyle, C., Studies in the physiology of parasitism. 11. (Ann. of Bot. Vol. 38. 1924.) — 10. Brown, W., Ann. of Bot. Vol. 33. 1923.) — 11. Burgeff, Untersuchungen uber Sexualität und Parasitismus bei Mucorineen. I. (Bot. Abhandl. 1924.) — 12. Cayley, D., Aversion and its Inheritance in Diaporthe. (Journ. of genetics. Vol. 24. Cambridge 1931.) — 13. David, R., Studies in Ophiobolus graminis Sacc. and the Take-all of disease of Wheat. (Journ. Agric. 1925.) — 14. De Bary, Bot. Ztschr. 1886. — 15. Doyer, Fusarium-Befall des Getreides. (Angew. Bot. Bd. 3. 1921.) — 16. Fawcett, H. S., Gummosis of Citrus. (Journ. Agric. Rec. Vol. 24. 1923.) — 17. Fischer und Gäumann, Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Jena (Gustav Fischer) 1929. — 18. Fleischer, Die Bodenkunde. Berlin (Paul Parey) 1922. — 19. Frank, B., Über den Einfluß, welchen das Sterilisieren ausübt. (Ber. d. dtsch. Bot. Ges. Bd. 4. Berlin 1888.) — 20. Frank, B., Die neuen Getreidepilze. (Ber. d. dtsch. Bot. Ges. Bd. 13. 1895.) — 21. Fulton, H., Chemotropism of Fungi. (Bot. Gaz. Vol. 41. 1908.) — 22. Greaney and Bailey, Root-Rots and Foot-Roots of Wheat in Manitoba. 1927. — 23. Greig-Smith, B., The bacteriotoxins and the agricere of soils. (Zentralbl. f. Bakt. Bd. 2. 1911.) — 24. Hemmi, T., and Shizuko, Kurata, Pathological Studies on Polyperus betulinus. Kyoto (Japan) 1931. — 25. Henry, D. W., The natural microflora of the soil in relation to the foot-rot problem of wheat. (Can. Journ. Res. 1931.) — 26. Hiltner, L., Die Fußkrankheit des Getreides.

(Sachs. landw. Ztg. Nr. 33. 1894.) — 27. Kappen, H., Die Bodenversäuerung: Ursachen, Folgen, Abhilfe. — 28. Kappen, H. und Beling, R., Über die Chinhydron-Methode und über die Beziehungen ihrer Resultate zu den Aziditätsformen der Böden. (Ztschr. f Pflanzenernahrg. u. Dung. Teil A. Bd. 6. 1916.) — 29. Kappen und Bergeder, Ztschr. f. Pflanzenernahrg. u. Dung. Teil A. 1926. — 30. Kirchner, O., Die Krankheiten und Beschadigungen unserer landwirtschaftlichen Kulturpflanzen. 1906. — 31. Klebahn, H., Haupt- und Nebenfruchtform der Askomyzeten. Leipzig 1918. — 32. Krampe, O., Fusarium als Erreger von Fußkrankheiten an Getreide. (Arb. d. biol. Reichsanst. Berlin. 1926.) — 33. Kruger, Untersuchungen über die Fußkrankheiten des Getreides. (Arb. d. Kais. Biol. Anst. Bd. 6. 1908.) — 34. Küster, E., Keimung und Entwicklung von Schimmelpilzen in gebrauchten Nährlösungen. (Ber. d. dtsch. Bot. Ges. Bd. 26 a. 1908.) — 35. Kuster, E., Über die chemische Beeinflussung der Organismen durcheinander. Leipzig 1909. — 36. Kuster, E., Kultur der Mikroorganismen. Berlin-Leipzig (Teubner) 1913. — 37. Liesegang, R. E., Gegenseitiges Wachstum bei Pilzkulturen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. 1920.) — 38. Lutz, O., Über den Einfluß gebrauchter Nährlösung auf Keimung und Entwicklung einiger Schimmelpilze. (Mykolog. Bd. 7. 1909.) — 39. Millard, W., and Taylor, G., Antagonism of microorganism as the controlling factor in the inhibition of scab by green manuring. (Ann. Appl. Biol. 1927.) — 40. Moritz, O., Entstehungsbedingungen und Verhütungsmoglichkeiten der Ophiobolose des Weizens. Aus der Zweigstelle Kiel d. Biol. Reichsanst. Kiel-Kitzeberg 1931. — 41. Moritz, O., Weitere Studien über die Ophiobolose des Weizens. Sonderdr. a. d. Arb. d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtschaft. Berlin-Dahlem 1932. — 42. Moritz, O., Zum Problem der Fußkrankheit des Getreides. (Angew. Bot. 1931.) — 43. Müller, O., Untersuchungen zur Entwicklungsphysiologie des Pilzmyzels. Berlin (Gebr. Borntraeger) 1922. — 44. Nägeli, Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionen und der Gesundheit. 1877. — 45. Nikitinsky, J., Über die Beeinflussung der Entwicklung einiger Schimmelpilze durch ihre Stoffwechselprodukte. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 40. 1904.) — 46. Porter, C., Phenomena Exhibited by Fungi when Grown in Close Proximity. (Amer. Journ. Bot.) — 47. Porter, C., Concerning the characters of certain fungi as exhibited by theyr growth in the presence of other fungi. (Amer. Journ. Bot. Vol. 11. 1924.) — 48. Pratt, C., Ann. Bot. Vol. 38. 1924. — 49. Pringsheim, E., Über den Einfluß der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze. (Ztschr. f. Bot. 1914.) — 50. Pringsheim, E., Über Kolonien mit Wachstum in einseits-wendigen Spiralen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. 1908.) — 51. Reese, H., Der Einfluß der gebrauchten Nahrlosung des Zn und Mn auf das Wachstum von Aspergillus niger. Diss. Kiel 1912. — 52. Reinhardt, O., Das Wachstum der Pilzhyphen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 23. 1892.) — 53. Rippel, Der Kulturboden und die Bestimmung seines Fruchtbarkeitszustandes. Bd. 1. Berlin (Julius Springer) 1931. — 54. Roberts, W., Morphological Characters of Alternaria Mali Roberts. (Journ. of Agric. Res. 1924.) — 55. Sandford, G., Some factors affecting the pathogenicity of Actinomyces scabies. (Phytopathologie. 1926.) — 56. Sandford and Broadfoot, A note on the biological control of root-rots of cereals. (Scient. Agric. 1931.) 57. Sandford and Broadfoot, Studies of the Effects of other Soil-Inhabiting Mikro-Organisms on the Virulence of Ophiobolus graminis Sacc. (Dominion Laboratory of Plant Patholog. University of Alberta, Edmonton. Alberta 1932.) — 58. Satoh, S., Studien über die Wirkungen der durch Ophiobolus Myabeanus gebrauchten Nährlösungen auf die Keimung und Entwicklung eines anderen Pilzes. Memoirs of the College of Agriculture. Kyoto (Imperial University) 1931. — 59. Schaffnit, E., Der Schneeschimmel und die übrigen durch Fusarium nivale hervorgerufenen Krankheiten. (Landw. Jahrb. Bd. 43. 1912.) — 60. Schaffnit, E. und Meyer-Hermann, Über den Einfluß der Bodenreaktion auf die Lebensweise von Pilzparasiten und das Verhalten ihrer Wirtspflanzen. (Phytopath. Ztschr. Bd. 2. 1930.) — 61. Schmidt, R., Untersuchungen über das Myzelwachstum der Phycomyceten. (Jahrb. f. wiss. Bot. 1925.) — 62. Simonds, P., Seedling Blight and Foot-Rots of Oats caused by Fusarium culmorum Sacc. Studies in Cereal. 1928. — 63. Sorauer, Handb. d. Pflanzenkrankh. 1923. — 64. Stakmann, L., Some fungi causing root and foot-rots of cereals. Studies in the Biol. Sciences. 1923. — 65. Stoklasa und Doerell, Handbuch der biophysikalischen und biochemischen Durchforschung des Bodens. Berlin 1926. — 66. Vasudeva, R. S., On the effect of one organism in reducing the parasitic activity of another. Studies in the physiology of parasitism. (Ann. of Bot. 1930.) —

67. Voges, E., Über Ophiobolus herpotrichus Fries der Weizenhalmtöter in seiner Nebenfruchtform. (Zentralbl. d. Bakt. Bd. 42. Jena 1915.) — 68. Voges, E., Die Witterung und die Fußkrankheit des Getreides. (Dtsch. Landw. Presse. 1913.) — 69. Volk, A., Beiträge zur Kenntnis der Wechselbeziehung zwischen Kulturpflanzen, ihren Parasiten und der Umwelt. 1931. — 70. Wehmer, C., Über Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. (Bot. Ztschr. 1891.) — 71. Wehmer, C., Selbstvergiftung in Penicillium-Kulturen. (Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1913.) — 72. Wehmer, C., Übergang älterer Vegetationen von Aspergillus fumigatus in „Riesenzellen" unter Wirkung angehäufter Säuren. (Ber. d. dtsch. Bot. Ges. 1913.) — 73. Wollenweber, H., Studies on the Fusarium-Problem. (Phytopathology. 1913.) — 74. Moritz, O., Weitere Studien über die Ophiobolose des Weizens. (Arb. d. Biol. Reichsanst. Bd. 20. 1932. Heft 1.)

Nachdruck verboten.

Die durch Pseudomonas tumefaciens (E. F. Smith et Townsend) Stevens verursachte Mauke der Weinreben.

[Aus der Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt in Berncastel-Cues a. d. Mosel.]

Von **Ludwig Niemeyer.**

Mit 9 Abbildungen im Text.

I. Die bisherigen Kenntnisse über die Mauke der Weinreben.

Die Mauke gehört zu den am längsten bekannten Rebenkrankheiten.

Hörter (43) schreibt 1822: „In unseren Rheinlanden sind von diesen die bekanntesten: a) der Ausschlag, Grind, Mauk, an der Mosel Hanap genannt, b) die Zehrung, c) die Gelbsucht, d) der Brand, Brenner, auch Laubrausch, e) die Altersschwäche." Über die Mauke sagt er: „An den drei bis vierjährigen Pflanzreben besonders im schweren fetten Boden, äußert sich im Frühjahre die höchste Thätigkeit und Fülle des Saftes. Die Saftröhre sind in diesem Alter am weitesten und mehr reizbar als an dem bejahrten Stocke; wenn daher häufige Nässe schnell mit Kälte wechselt, so zerplatzen dieselbe mehr oder weniger; es bildet sich am Rande der entstandenen Oeffnung, oben so wie neben dem Einschnitte in die Rinde eines jungen Baumes, Geschwülste (Grind), welche die freie Circulation des Saftes hemmen, somit das Gedeihen der jungen Rebstämme verhindern und endlich zerstören. Mittel gegen diese Krankheit giebt es kein anderes, als das Einlegen, welches vor Winter der Art geschieht, daß der Hals des Stocks hinlänglich mit reiner Erde bedeckt, und erst zur Zeit, wo keine Kälte mehr zu fürchten, entblößt wird. Man hat bemerkt, daß die jungen Schenkel, denen beim Reißen, ein Zweig von ein oder zwei Augen gelassen wird, dieser Krankheit weniger ausgesetzt sind, indem der Safttrieb in gemäßigterer Lebhaftigkeit sich äußert. An saftreichen bejahrten Schenkeln verursachten Maifröste die nämliche Krankheit aus derselben Ursache; sie können nicht anders als durch Einleger ersetzt werden."

Diese Beschreibung und Ansicht über Entstehung und Bekämpfung der Mauke ist in den späteren Veröffentlichungen (3, 5, 44, 60, 61, 154, 155, 185) immer wieder zu finden. Eingehender wird der Grind von Dornfeld (26) behandelt. Als besonders anfällig werden von ihm Silvaner und Blauer Portugieser angegeben. Kohler (58) empfiehlt 1869 als Bekämpfung Abschneiden der Stöcke unterhalb der Wucherungen — wie Dornfeld (26) — und Drainage der Weinberge. Die Arbeiten aus den siebziger Jahren (107, 154) bringen nichts wesentlich Neues über die Mauke. Große Bedeutung scheint sie um diese Zeit nicht gehabt zu haben; denn Goethe (35) schreibt im Jahre 1878: „Als im Herbst 1876 ein Stück eines Rebstocks

auf den Tisch des Weinbaucongresses in Creuznach gelegt wurde, . . . kannte keiner der gerade Anwesenden diese höchst auffällige, nach der Mitteilung des Einsenders verderbliche Krankheitserscheinung, welcher nachgesagt wurde, daß sie ganze Rebenanlagen zu zerstören imstande sei." Goethe beschäftigte sich daraufhin eingehender mit der Krankheit, die nach seiner Ansicht „in gewissen Lagen schon so lange vorkommt, als man dort Reben baut". Als besonders empfindlich bezeichnet er die sog. weichhölzigen Sorten wie Portugieser, Trollinger, Silvaner. Die um 1880 erschienenen Schriften weichen inhaltlich nicht wesentlich von den Mitteilungen Hörters und Goethes ab (40, 56, 63, 75, 189). Der Weinbote, Trier (120) bringt einen Aufsatz ohne Angabe des Verf.s, in dem im Gegensatz zu Goethe den Spätfrösten als Ursache der Mauke eine geringe Bedeutung beigelegt wird. Außerdem wird hier wohl zum erstenmal deutlich ausgesprochen, daß der Grind keine Krankheit ist, die sich über die ganze Pflanze verbreitet, sondern ein „örtliches Übel" darstellt. Die Mauke ist nach Ansicht des Verf.s „keine krebsartige Krankheit, welche keine Ansteckung oder Säftevergiftung" herbeiführt. Schon in den älteren Arbeiten wird darauf hingewiesen, daß die Reben bei übermäßiger Bodenfeuchtigkeit leicht an Grind erkranken (40, 56, 75). Den Begriff der Disposition bringt wahrscheinlich als erster Kübler (75) deutlich zum Ausdruck, indem er schreibt, daß „andauerndes Übermaß von Bodenfeuchtigkeit die Reben zum Grind disponiert (empfindlich oder geneigt) macht". Als besonders anfällig werden Klevner und Burgauer (Elbling) angegeben. Von den übrigen Rebsorten soll keine von der Krankheit ganz verschont bleiben.

Eine Zusammenstellung der älteren Maukeliteratur von 1853 ab bringen Hedgcock (39) und Smith u. a. (175).

Hiernach hat Cavara (17, 18) als erster nachgewiesen, daß die Mauke bakteriellen Ursprungs ist, was in den Arbeiten von Corvo (23) und Cuboni (24) zwar auch schon angegeben, aber noch nicht hinreichend bewiesen wird. Die endgültige Bestätigung, daß die Tumoren durch ein Bakterium hervorgerufen werden, bringt Hedgcock auf Grund seiner 1903 begonnenen und 1910 veröffentlichten Untersuchungen (39). Ihm gelang es einwandfrei, das Bakterium aus den Wucherungen von Reben zu isolieren und mit Reinkulturen wieder gleichartige Tumoren hervorzurufen. Der Erreger glich dem von Smith und Townsend (177) beschriebenen und mit Bacterium tumefaciens bezeichneten Spaltpilz. Eine Beschreibung wird von Hedgcock nicht gegeben.

Größeres Allgemeininteresse gewann die Mauke, als Zusammenhänge zwischen dieser Krankheit und dem tierischen Krebs erörtert wurden (10, 29—31, 53, 55, 79, 85, 87, 89—91, 99, 100, 137, 163, 164, 170, 172, 173, 178, 186). Weitere Arbeiten über die Mauke der Reben und einige andere, die in enger Beziehung dazu stehen, sind im Text erwähnt. Eine ausführliche Zusammenstellung des Schrifttums über Pseudomonas tumefaciens findet sich bei Elliot (27).

II. Krankheitsbild.

1. Aussehen der Wucherungen.

Als Mauke der Reben bezeichnet man höcker- oder leistenförmige Wucherungen, die meist am alten Holz (Schenkel) bis etwa 30 cm über dem Boden entstehen. Die alte Rinde wird hierbei abgehoben und allmählich zum Zerreißen gebracht. Zwischen den Rindenfasern erkennt man Knötchen von schmutzig hellgelber Farbe, die ziemlich schnell größer werden und sich braun verfärben. Bei weiterer Größenzunahme zerreißt die alte Rinde immer

mehr, so daß sie am Ende des Sommers nur noch in einzelnen Strängen auf den Maukewucherungen zu erkennen ist (Abb. 1—4). Die Geschwulst selbst kann den Schenkel teilweise oder ganz umgeben. Seltener tritt die Krankheit am zweijährigen Holz der Bogreben (Buglinge) auf. Am einjährigen Holz ist sie 1891 von Müller-Thurgau (114) in Weinbergen der Schweiz, die im Juni durch Hagel stark gelitten hatten, beobachtet worden. Viala (188) und Pfeiffer (132) bildeten ein- und zweijährige maukekranke Rebtriebe ab.



Abb. 1. W. Elbling am 8. Nov. 1932 durch 10 Nadelstiche mit Stamm VII infiziert; im folgenden Jahr sind Maukewucherungen auf der ganzen Strecke entstanden; aufgenommen am 30. Okt. 1933; das gleiche Bild zeigt sich bei starkem Befall des ofteren im Weinberg; 1 : 2,5.

Unter der Erdoberfläche entstehen am Schenkel selten Wucherungen (8). Im allgemeinen findet man sie hier nur, wenn die Stöcke zu tief gepflanzt oder später versenkt worden sind. Auf einem Weingut bei Trier wurden vor etwa 5 Jahren rund 1200 Rieslingstöcke ausgehauen, weil sie infolge oberirdischer Maukewucherungen stark rückfällig waren. An den unterirdischen Teilen wurden hierbei in keinem Falle Wucherungen beobachtet.

An den Wurzeln von Rebstöcken, die im Weinberg ausgehauen wurden, sind bisher keine Tumoren festgestellt worden. In Rebschulen werden dagegen gelegentlich auch an Wurzeln Wucherungen gefunden, öfter noch an den unteren Enden (Fußmauke) und an den Blendstellen der eingelegten Setzhölzer (180). Die Tumoren erreichen hier bisweilen die Größe eines Hühnereies.

An Pfropfreben können auch an der Pfropfstelle Wucherungen entstehen und zwar als einzelne mehr oder weniger kugelförmige Gebilde oder als Wülste, die um den ganzen Sproß herumreichen (25, 31, 64—69, 74, 190). Sie dürfen nicht mit übermäßig starken, unregelmäßig gestalteten Kalluswülsten, wie sie bei schlecht aufgesetzten Edelreisern vorkommen, verwechselt werden (144). Diese Kalluswucherungen gehen jedoch an

Reben meistens schon im ersten Jahre zugrunde und machen die Pfropfreben nicht unbrauchbar, wie dies durch echte Mauke an der Pfropfstelle meistens geschieht. Vielleicht bestehen Zusammenhänge zwischen Maukeanfälligkeit und Wachstumsstärke von Edelreis und Unterlage in dem Sinne, daß eine Pfropfrebe mit gleich stark wüchsigen Komponenten wenig gefährdet ist und die Anfälligkeit mit zunehmender Verschiedenheit der Wachstumsintensitäten steigt.

Bei manchen Pflanzen entstehen an den Tumoren Wurzeln oder Sprosse (14, 78, 81, 92, 100, 116, 165, 167—169, 192). An Freilandreben wurden derartige Bildungen weder bei spontanen, noch bei künstlichen Infektionen beobachtet. An Topfreben im Gewächshaus entwickelte sich nur einmal bei Riesling auf einer Wucherung eine Knospe, die jedoch abstarb, ehe sie „aus der Wolle“ kam. An Pelargonien war dagegen die Entstehung von Blättchen bis zu etwa 1 cm Durchmesser verhältnismäßig häufig. Ebenso traten bei Tomaten sehr oft Knospen an den Tumoren auf. Wurzelbildungen haben sich jedoch auch bei diesen beiden Pflanzen niemals gezeigt. Die Wucherungen an Rizinuspflanzen blieben frei von Knospen und Wurzeln.



Abb. 2 a. Einjährige Maukewucherung an einem Elblingstock; etwa 1 : 1.

2. Wirkung auf den Stock.

Im Weinberg zeigen stark maukekranke Stöcke Kümmerwuchs und wenigstens beim Riesling oft chlorotische Verfärbung des Laubes. An kranken Spätburgunderstöcken tritt nach Mitteilung von Weinbauoberlehrer Rademacher, Ahrweiler, die Herbstfärbung frühzeitiger ein und die Trauben zeigen höheres Mostgewicht.

Schneidet man einen maukekranken Rebstock an der Stelle der Wucherung quer durch, so erkennt man mit bloßem Auge, daß diese von Markstrahlen und Kambium ausgeht (22). Die Tumoren sind im Innern weitgehend verholzt, in den äußeren, jüngeren Partien dagegen noch fleischig. Abgestorbene Rindenteile, Schieferstückchen und Erdteilchen können umwuchert werden und so in das Innere der regellos aus den verschiedenen Zellelementen des Sprosses aufgebauten Geschwülste gelangen. Im Herbst sterben die Wucherungen zum größten Teil ab. Der innere ziemlich fest verholzte „Kern“ kann die Unbilden des Winters überdauern und im nächsten Sommer der Ausgangspunkt neuer Gewebewucherungen werden. Die vorjährigen abgestorbenen Teile der Tumoren werden dann als Kappen abgehoben und nach einiger Zeit vollständig vom Stock losgelöst. Dieser Vorgang spielt sich nicht nur an Reben ab, sondern auch an Apfelbaum, Pelargonium, Tomate und Rizinus. Auch wenn man die drei genannten, nicht oder nur wenig verholzten Pflanzen den Winter über im geheizten Gewächshaus

aufstellt, wachsen die Tumoren nicht unbegrenzt, sondern haben in ihren äußeren Teilen nur eine beschränkte Lebensdauer. Der innere „Kern“ dagegen kann jahrelang am Leben bleiben und immer wieder neues Wucherungsgewebe hervorbringen.

Auf den äußeren abgestorbenen Geweben siedeln sich verschiedene Pilze an, die in fruheren Jahren als Erreger der Krankheit angesehen wurden (114). Es ist jedoch nie gelungen, durch Übertragung dieser Pilze auf gesunde bzw. verletzte Reben Wucherungen hervorzurufen.

Durch den Zerfall des abgestorbenen Tumors wird, wenn keine Neubildung erfolgt, der Holzkorper allmahlich freigelegt und den Unbilden der Witterung und Fäulniserregern preisgegeben.

III. Verbreitung und wirtschaftliche Bedeutung.

Da Pseudomonas tumefaciens nicht nur Reben, sondern auch Obstbäume und viele andere Pflanzen befällt und daruber eine große Anzahl von Literaturangaben aus Afrika, Amerika, Asien, Australien und Europa vorliegen, kann man sagen, daß dieser Parasit in allen Ländern, auch in Gegenden ohne Weinbau, zu finden ist. Über die Starke des Auftretens der Mauke in außerdeutschen Weinbaugebieten waren Angaben nicht zu erlangen.



Abb. 2 b. Mehrjahrige Maukewucherung an einem Elblingstock; etwa ½ naturl. Große.

Nach einer im Oktober 1933 bei sämtlichen deutschen Weinbauanstalten gehaltenen Umfrage, nach Literaturangaben und eigenen Beobachtungen kommt die Mauke in allen deutschen Weinbaugebieten vor, hat aber im allgemeinen keine besondere wirtschaftliche Bedeutung (6, 97, 98, 195—206).

Sie tritt nur dort stärker auf, wo das Wachstum des Stockes durch ungunstige Umweltbedingungen gestort ist und die Erziehungsart ihr Auftreten begunstigt. Dies gilt z. B. fur den wurttembergischen Weinbau, wo sich im Keupergebiet schlecht durchluftete schwere Lettenböden mit hohem Wassergehalt vorfinden und die Erziehung langer, alter, häufig am Boden hinkriechender Schenkel üblich ist. Auf den schweren Triaskalkböden der Obermosel hat sich Mauke in wirtschaftlich schädigendem Ausmaß an Elbling dann gezeigt, wenn Weinberge auf ehemaligem Wiesengelände da angelegt wurden, wo infolge einer undurchlässigen Schicht stauende Nässe im Boden vorhanden war. Auf einem Weingut im Ruwertal zeigte sich Mauke im Jahre 1923 außerordentlich stark, nachdem die Bodenbearbeitung jahrelang sehr vernachlässigt worden war. Auf den vor etwa 25 Jahren angelegten Preuß. Weinbaudomänen im Reg.-Bez. Trier trat die Krankheit um das Jahr 1920

in Versuchsparzellen mit Kordonerziehung bei starkem Rückschnitt so schädigend auf, daß ganze Quartiere neu gesetzt werden mußten.

Die an der Zweigstelle durchgeführten Versuche erstreckten sich größtenteils auf wurzelechte Reben, während über Mauke an Pfropfreben an der Lehr- und Forschungsanstalt in Geisenheim gearbeitet wurde (64—74). Es scheint aber, daß die Mauke auch an Pfropfreben nur dann wirtschaftliche Bedeutung erlangt, wenn entweder die Umweltbedingungen für die Pfropfrebe ungünstig sind oder keine befriedigende Affinität zwischen Unterlage und Edelreis besteht.

IV. Erreger.

1. Voraussetzungen für das Auftreten der Krankheit.

Aus zahlreichen Literaturangaben und Beobachtungen geht hervor, daß zwischen dem Auftreten von Frösten, insbesondere Frühjahrsfrösten und dem Vorkommen der Mauke Beziehungen bestehen. Die Kälte wurde daher vielfach als Ursache der Krankheit angesehen (19, 26, 58, 94, 95, 111, 133, 134, 159, 194). Genaue Beobachtungen über das Auftreten der Mauke in den einzelnen Lagen und Jahren hätten allerdings schon damals zu der Erkenntnis führen müssen, daß der Frost nicht die eigentliche Ursache sein kann (32); denn maukekranke Stöcke werden auch in Jahren ohne Fröste oder in Lagen gefunden, die nicht unter Kälte gelitten haben, oder in Gegenden, in denen keine Fröste auftreten (12, 157, 180). Ein Einfluß der nach dem Austrieb eintretenden Spätfröste auf das Auftreten der Mauke kann nicht abgestritten werden. Anderseits fand man nach dem kalten Frühjahr 1929 (Tiefsttemperatur im Februar - 21,1°) an der Mosel, wo sehr viele Stöcke Frostrisse gezeigt hatten, maukekranke Stöcke nur in geringer Zahl.



Abb. 3 a. Maukewucherung an einem Elblingstock durch zahlreiche flache Infektionsstiche mit Stamm VII hervorgerufen; 7 Monate nach der Infektion; 1 : 1.

Eine ähnliche Bedeutung kommt aber auch anderen Witterungsunbilden zu (28, 33). Im Jahre 1927 entwickelte sich Mauke Anfang September in größerer Menge in Weinbergen an der Saar, die durch Hagelschlag am 27. Juli besonders stark gelitten hatten. Nach einem Hagelunwetter, das am 11. Aug. 1933 über Obermosel und Saar niederging und stellenweise 90% der Ernte vernichtete, bildeten sich z. B. an Amerikanerreben (Aramon × Riparia 143 B M. G.) im Rebschnittgarten der Preuß. Rebenveredlungsanstalt Berncastel-Cues bei Wiltingen a. d. Saar in wenigen Wochen faustgroße Wucherungen. Es handelt sich bei diesen Maukeerkrankungen in manchen Fällen nicht um Neuinfektionen, sondern um verstärktes Wachstum bereits vor-

handener kleiner Tumoren. Häufig finden sich an den Rebschenkeln Wucherungen von Erbsengröße, werden aber von alten Rindenstreifen überdeckt und vom Winzer nicht beachtet. Diese kleinen Wucherungen können zu besonderem Wachstum angeregt werden, wenn der Stock irgendwelche Wachstumsstörungen erleidet. Bei Hagelschäden wird das Laubwerk in mehr oder weniger weitgehender Weise vernichtet und dieses plötzliche Mißverhältnis zwischen den ober- und unterirdischen Ernährungsorganen der Rebe gibt den Anstoß zu stärkerem Wachstum der Tumoren. Nach Mitteilung der Preuß. Rebenveredlungsanstalt Berncastel-Cues entwickelten sich im Jahre 1912 in einem Weinberg bei Berncastel Maukewucherungen hauptsächlich an den Stöcken, deren junge Triebe Anfang Juni durch einen Sturm ausgebrochen worden waren. Künstlich hervorgerufene Wachstumsstockung, z. B. starker Rückschnitt, kann, wie wir noch sehen werden, bei Topfreben dieselbe Wirkung haben. An Rebtrieben, die vom Blitz getroffen waren, beobachtete Lüstner (96) maukeähnliche Wucherungen und bezeichnete diese als „Blitzmauke" im Gegensatz zur „Frostmauke".



Abb. 3b. Maukewucherung an einem Elblingstock durch zahlreiche flache Infektionsstiche mit Stamm VII hervorgerufen; 9 Monate nach der Infektion; etwa 1 : 1.

Auch ungünstige Bodenverhältnisse, besonders stauende Nässe, sind schon frühzeitig als fördernde Umstände für die Maukeerkrankung der Reben erkannt worden (5, 25, 58, 75, 88, 95, 131). Durch hartes, scharfkantiges Gestein werden an den Rebschenkeln Verletzungen hervorgerufen, an denen sich unter entsprechenden Vorbedingungen Wucherungen bilden. Übermäßige oder das Holzwachstum einseitig fördernde Düngung wirkt begünstigend auf die Entwicklung der Mauke (21, 110), ebenso falscher Schnitt (57).

2. Isolierung und Züchtung des Erregers; Morphologie und Physiologie.

In der Literatur finden sich über die Isolierung des Maukeerregers aus Wucherungen widersprechende Angaben. Nach einigen Autoren ist sie leicht (88, 102, 104, 124, 158), nach anderen recht schwierig (46, 115).

Bei den eigenen Isolierungsversuchen wurden frische Maukewucherungen von Reben äußerlich mit 0,1 proz. Sublimatlösung abgewaschen und mit sterilem destillierten Wasser nachgespült, mit sterilem Skalpell an

einer Seite ein wenig eingeschnitten und auseinandergebrochen. Kleine, von der Bruchfläche entnommene Gewebestückchen wurden auf 2 proz. Malzextrakt- oder Möhrenagar (s. u.) ausgelegt und die sich im Brutschrank bei 28° (20) daran entwickelnden Bakterien in Gußplatten getrennt.

Im ganzen wurden aus Maukewucherungen an Reben 125 Bakterienstämme gezüchtet, von denen 42 = 33,6% an Tomaten Wucherungen hervorriefen. Hoch virulent waren gegenüber Reben, Tomaten und Pelargonien nur 2 Stämme (Laboratoriums-Nr. T 363 I und T 363 III).

Für die Impfversuche wurden 7 Stämme in Reagenzgläsern auf festen Nährböden gezüchtet. Der Einfachheit halber sollen die Stämme mit den Ziffern I—VII bezeichnet werden.

Stamm I „Maukeerreger Stamm Berncastel" von Prof. Dr. Lieske, Berlin, gezüchtet, 15. März 1927 erhalten,
„ II Bacterium tumefaciens aus der Sammlung der Biologischen Reichsanstalt in Berlin-Dahlem, 1928 erhalten,
„ III Bacterium tumefaciens aus dem Centraalbureau voor Schimmelcultures in Baarn (Holland), 1928 erhalten,
„ IV Pseudomonas tumefaciens, Stamm Chrysanthemum frutescens IIa, von Oberregierungsrat Dr. Stapp, Berlin-Dahlem, gezüchtet, 1929 erhalten;
„ V Pseudomonas tumefaciens, Stamm Chrysanthemum frutescens IIb, von Oberregierungsrat Dr. Stapp, Berlin-Dahlem, gezüchtet, 1929 erhalten,
„ VI T 363 I } 1931 gewonnen aus Wucherung an Tomate, deren Infektion
„ VII T 363 III } mit einer unmittelbar vorher durch frische Rebenmauke gestoßenen Nadel erfolgt war.

Als Nährboden diente für diese Stämme durchweg in folgender Weise hergestellter Möhrenagar:

500 g geschälte, geriebene Möhren in 1 l Wasser ½ Std. gekocht, filtriert, Filtrat mit 1,8% Agar versetzt, vor dem Eingießen in Reagenzgläser Na_2CO_3 zugegeben bis zur eben erkennbaren Rotfärbung von Phenolphtalein. Bei längerer Aufbewahrung geht die Reaktion langsam zurück (184). Die Kulturen standen bei diffusem Tageslicht und Zimmertemperatur. Die regelmäßige Übertragung auf frischen Nährboden erfolgte etwa alle 4 Wochen. Für die Infektionsversuche wurden Abimpfungen jeweils nach Bedarf vorgenommen.

Unterschiede im Verhalten auf Möhren- oder Malzextraktagar zeigten die Stämme I—VII nicht. Die Kolonien waren feucht glänzend, aufliegend, weich und etwas schleimig, mit glattem Rand. Die Maße der Einzelzellen betrugen 0,5—1 × 1,0—1,8 μ. Obgleich Smith in seinem Buch „An Introduction to bacterial Diseases of Plants" eine sehr ausführliche Charakteristik des Pflanzenkrebserregers gegeben hat, sind bezüglich seiner Morphologie und Physiologie noch verschiedene Fragen nicht oder doch nicht ausreichend geklärt. Es soll hier im einzelnen nicht darauf eingegangen, sondern nur auf einige Arbeiten hingewiesen werden (46—50, 83, 90, 153, 156, 182, 192).

Die meisten aus Maukewucherungen isolierten Bakterienstämme behielten die Fähigkeit, wiederum Wucherungen hervorzurufen, nur kurze Zeit. Um zu sehen, ob durch einen Wechsel des Nährsubstrates eine Steigerung der Virulenz erzielt werden könnte, wurden die 15 am besten wirkenden Stämme auf 10 verschiedene Nährböden übertragen. Diese setzten sich wie folgt zusammen:

1. Rebstielauszug Gelatine normal: 10 g geschälte Rebblattstiele ½ Std. in 1 l Wasser gekocht, filtriert, Filtrat mit 5% Zucker und 15% Gelatine weiter verarbeitet; pH 4.

2. Rebstielauszug Agar normal: Herstellung wie bei 1., statt der Gelatine 2% Agar; pH 4,5.
3. Rebstielauszug Gelatine entsauert
4. Rebstielauszug Agar entsauert
} Herstellung wie bei 1. bzw. 2., jedoch Rebstielauszug mit Calciumcarbonat aufgekocht.
5. Rebstielauszug Agar mit Na_2CO_3 eingestellt auf pH 8.
6. Bodenextrakt Gelatine: 1 kg Weinbergsboden (Feinerde < 2 mm Korngroße) mit 2 l Wasser im Wasserbad 2 Std. gekocht, nach dem Absetzen uberstehende Flussigkeit mit Talkum aufgekocht und abfiltriert, 15% Gelatine und 0,05% K_2HPO_4 zugesetzt; pH 4 (93).
7. Bodenextrakt Agar: Zubereitung wie bei 6., statt der Gelatine 2% Agar; pH 6,5.
8. Bodenextrakt Agar: Zubereitung wie bei 7., eingestellt mit Na_2CO_3 auf pH 8.
9. Möhrenextrakt Agar: hergestellt wie angegeben und mit Na_2CO_3 eingestellt auf pH 7,5.
10. Fleischwasserpepton Agar: 1% Fleischextrakt, 1% Pepton, 0,5% NaCl, 1,5% Agar in Wasser; mit Na_2CO_3 eingestellt auf pH 7,5.

Die Impfungen wurden mit 10 Tage alten Kulturen vorgenommen, die bei 18° gewachsen waren. 13 auf den Nährböden gewachsene Stämme übten auf Tomaten keine Wirkung aus, während 2 vom Nährboden 10 Wucherungen hervorriefen. Als Kontrolle diente Stamm 1, gezüchtet auf denselben Nährböden. Die schwächste Wirkung zeigte sich beim Nährboden 2, eine geringe Steigerung bei 3 und 6, eine etwas stärkere bei 1, 4, 5 und 8 und die beste Wirkung bei 7, 9 und 10.

Verschieden alte Kulturen virulenter Stämme zeigten in Vergleichsimpfungen keine Unterschiede in ihrer Wirksamkeit, die man auf das Alter der Kulturen hätte zurückführen können (80, 83).

3. Künstliche Übertragung auf Reben, Apfelsämlinge und krautige Pflanzen.

Als Versuchspflanzen dienten hauptsächlich 15 wirtschaftlich wichtige Sorten der Europäerrebe, Vitis vinifera, die als Ertragsreben im Versuchsgelände beim Dienstgebäude und im Weinberg oder als Topfreben im Gewächshaus und im Versuchsgelände standen (die Anzucht der Topfreben ist eingehend behandelt in Arb. a. d. Biol. Reichsanstalt. Bd. 17. 1929. S. 36). In einigen Versuchen wurden neben wurzelechten Europäerreben auch Pfropfreben mit Amerikanerunterlagen bzw. wurzelechte Amerikanerreben verwendet, da diese zur Verfügung standen. Die Artbezeichnungen sind an den betreffenden Stellen angegeben.

Von Gehölzen wurden außerdem geimpft: Apfelsämlinge, Pirus malus, und Johannisbeere, Ribes sanguineum („Rote Holländische“ und „Rote Kirsch“).

Manche Versuche ließen sich an krautigen Pflanzen im Gewächshaus schneller und leichter durchführen. Als sehr gut brauchbar erwiesen sich Pelargonium (P. zonale), Sorte Meteor, und Tomate (Solanum lycopersicum), Sorten Bonner Beste, Tuckswood, Dänischer Export, Erste Ernte. Als weniger vorteilhaft erwies sich Ricinus communis. Die genannten Pflanzen standen zumeist in Tontöpfen von 12 cm Durchmesser während des Sommers bei Temperaturen von 20—35°, während des Winters bei 15—20°. Die Pelargonien wurden aus Stecklingen ein- oder mehrtriebig, die Tomaten aus Samen im allgemeinen eintriebig gezogen. Bei entsprechendem Rückschnitt erreichten Tomatenpflanzen ein Alter von

2 Jahren. Alle verwendeten Sorten waren gleich gut geeignet. Rizinuspflanzen, die wegen ihrer hohlen Internodien für manche Versuche besser, für andere weniger gut brauchbar als Tomaten und Pelargonien, aber sehr anfällig gegenüber Roter Spinne (Epitetranychus althaeae) waren, wurden wie Tomaten aus Samen herangezogen.

Von den auf schrägen Nährboden in Reagenzgläsern gewachsenen Bakterienkulturen wurde zur Infektion eine Platinöse voll entnommen, in diese die Spitze einer sterilen Nadel getaucht und darauf der zu impfende Pflanzenteil durchstochen oder angestochen (Abb. 4, 5). In einzelnen Fällen diente zum Anschneiden der Pflanzen ein ebenso infiziertes Skalpell. Geköpfte Pflanzen wurden geimpft durch Bestreichen der Schnittflächen mit einer Bakterienkultur mittels einer Platinöse. Bei den Versuchen hat sich gezeigt, daß die Dicke der Nadel keinen wesentlichen Einfluß auf den Erfolg der Impfung ausübt.



Abb. 4a. Abb. 4b. Abb. 4c.

Abb. 4. W Elbling am 18. Okt 1932 durch 10 Nadelstiche mit Stamm VII infiziert; Aussehen der 8 unteren Stichstellen: a am 17. Juni, b am 21. Juli, c am 30. Okt. 1933; etwa $^2/_3$ nat. Größe.

Im allgemeinen haben Nadelstiche wesentlich bessere Infektionsergebnisse gezeitigt als Schnitte. Bei diesen bildeten sich in vielen Fällen Wucherungen nur am Anfang und Ende, während das mittlere Stück frei blieb.

Die Übertragung des Maukeerregers auf die Pflanze konnte nicht mit einer Impfnadel vorgenommen werden bei Versuchen, in denen Mittel zum Abdecken bzw. Desinfizieren von Wunden geprüft werden sollten. Für diese Fälle erschien die Impfprobe durch Überfließenlassen einer Bakterienaufschwemmung über die verletzte und behandelte Stelle am einfachsten.

Zur Prüfung der Methode wurden an je 4 Tomatenpflanzen mit sterilem Skalpell je 5 Längsschnitte gemacht, über die man aus einer Pipette eine Bakterienaufschwemmung in der ersten Versuchsreihe in destilliertem Wasser, in der zweiten in Blutungssaft von Tomate fließen ließ. Nach 4 Wochen hatten sich in der ersten Reihe an 87%, in der zweiten an 85% der Schnitte Wucherungen gebildet, während von 18 Schnitten mit infiziertem Skalpell 95% positiv verlaufen waren. In späteren Versuchen ergaben die Kontroll-

pflanzen auch bei Überfließenlassen bzw. Aufträufeln einer Bakterienaufschwemmung in destilliertem Wasser auf Nadelstiche 100% Befall.

Auch durch Bestreichen frischer Wunden gesunder Tomatenpflanzen mit Stücken aus dem Innern lebender Tumoren konnten neue Wucherungen erzielt werden.

Nach Angaben in der Literatur verwächst Tumorengewebe, auf artgleiche gesunde Pflanzen übertragen, mit diesen und nimmt weiter an Größe zu (54, 74). Um dies nachzuprüfen, wurden 2 Rizinuspflanzen mit je 5 Längsschnitten versehen und in diese je 1 Stück einer Wucherung von einer anderen Rizinuspflanze eingeschoben. Die Tumorstücke waren nicht eingeheilt, neue Wucherungen hatten sich nicht gebildet.

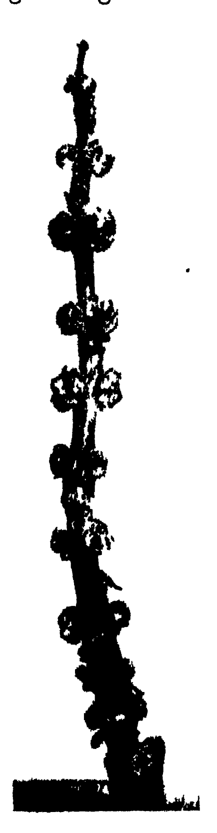


Abb. 5. Etwa 4 Monate alte Maukewucherungen an einer mit Stamm VII geimpften Elbling-Topfrebe; etwa $^2/_3$ nat. Große.

Stücke lebender Mauke von einer Pfropfrebe (Sorte nicht bekannt) in 2 Längsspalten einer Riesling × Silvaner-Topfrebe eingeschoben, in einem anderen Fall auf eine durch Flächenschnitt entstandene Wunde aufgebunden, heilten nicht ein und veranlaßten auch keine Gewebeneubildungen. Abgestorbenes Maukegewebe von einer Pfropfrebe rief bei Riesling × Silvaner in 2 Längsschnitte eingeschoben, ebenfalls keine Wucherung hervor. Die behandelten Triebe waren bereits verholzt (187).

Frische Tumoren entstanden, als von einer Wucherung an Tomaten Stückchen in Längsschnitte anderer Tomatensprosse eingeschoben wurden in 3 von 20 Fällen. Die eingeschobenen Stückchen vertrockneten bald (84).

Übertragungen von Maukestückchen auf Rizinus und Tomate blieben erfolglos.

Auftragen von Bakterienkulturen auf unverwundete Rinde der Reben blieb, den Angaben in der Literatur entsprechend, ergebnislos (88, 141).

An Rebstöcken finden sich die Maukewucherungen meistens unterhalb der Triebe mit grünen Blättern. Da die Tumoren selbst kein Chlorophyll enthalten, müssen sie ebenso wie die Wurzeln von den Blättern mit Assimilaten versorgt werden. Die Wucherung kann also vielleicht durch eine Drosselung des Nährstoffstromes (2) nach der Wurzel zu erhöhtem Wachstum angeregt werden. Zur Prüfung dieser Annahme wurden um 10 Elbling- und 30 Riesling-Pfropfreben Drähte gelegt, die das Rindengewebe schwach eindruckten, und die Elbling- und 20 Rieslingreben mittels 10 Stichen durch die Internodien oberhalb des Drahtes infiziert. Bei den 10 anderen Rieslingreben wurden je 5 Stiche unter und über dem Draht angebracht (Stamm I). 5 Rieslingreben, die zur Kontrolle dienten, wurden in derselben Weise mit Draht umgeben und zehnmal mit einer nicht infizierten Nadel durchstochen. Sie blieben ohne Wucherungen. An den infizierten Reben entstanden beim Elbling nur eine (= 1%), beim Riesling in der ersten Gruppe 5 (= 2,5%), in der zweiten unter dem Draht eine (= 2%), über dem Draht 2 (= 4%) Wucherungen. Wegen des geringen Befalls ließ sich also kein klarer Beweis für die oben mitgeteilte Annahme gewinnen.

An je 6 Riesling-Topfreben wurde die Ableitung der Assimilate durch einen ringförmigen Schnitt bzw. durch eine Ringelung, bei der ein Streifen von etwa 5 mm Breite aus der Rinde rings um den Stamm herum entfernt wurde, unterbrochen und bei je 3 Reben der beiden Gruppen die Wunden durch Bestreichen mit einer Kultur des Stammes I infiziert. Bei dem einfachen Ringschnitt bildeten sich in allen Fallen starke Schwellungen innerhalb der Rinde und zwar oberhalb des Schnittes mehr als doppelt so stark als unterhalb. Bei den geringelten Reben entstanden ebenfalls Anschwellungen des Rindengewebes bis etwa 1 cm oberhalb und 0,5 cm unterhalb des Ringes. Ein Erfolg der Impfung war nicht erkennbar.

Fur später zu erörternde Bekämpfungsmaßnahmen war zu prüfen, ob der Krankheitserreger bei der Verwundung eindringen muß, oder ob eine Infektion auch noch später erfolgen kann. Riker (141) gelang sie noch nach 7 Tagen. Es wurden daher Tomaten mit steriler Nadel 10 mal durchstochen und nach einer Zwischenzeit von 30 Min. bis 48 Std. mit einer Bakterienaufschwemmung (Stamm 1) beträufelt. Wucherungen entstanden z. B. nach 14, 22, 32 und 48 Std. Abstand zwischen Verwundung und Impfung an 95, 80, 70 und 80% der Stichstellen. Bei Rizinus verliefen 30 und 15% der Impfungen positiv bei einem Abstand von 40 bzw. 48 Std.

Die Kontrollpflanzen, bei denen die Impfung gleich nach der Verletzung erfolgte, zeigten bei beiden Pflanzenarten 100% Befall.

Da Rizinuspflanzen nicht mehr zur Verfügung standen, wurden zur Fortsetzung nur noch je 2 Tomaten je 10 mal durchstochen und nach 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 bzw. 10 Tagen beimpft. Nach 2 Mon. konnten 80, 55, 65, 45, 45, 10, 10 bzw. 10% der Stichstellen als befallen festgestellt werden.

Bei einer nachfolgenden gleichartigen Versuchsreihe fand eine Ausdehnung der Zeitspanne zwischen Verwundung und Impfung von 11 auf 33 Tage statt. Positive Erfolge waren nur bei 11 und 12 Tagen Abstand mit 18 bzw. 5% Befall zu verzeichnen.

Nach diesen Versuchen kann also der Krankheitserreger bei Tomate und Rizinus noch nach mehreren Tagen in die Wunde eindringen und Infektion bewirken. Ob mit 12 Tagen bei Tomate die Grenze erreicht ist, erscheint zweifelhaft. Die Versuche konnten erst im Spatherbst durchgefuhrt werden und lieferten auch in der Kontrolle nur 92% Befall. Bei Rizinus entstanden bei verspäteter Infektion bedeutend weniger Wucherungen als bei Tomate. Auf die Ermittlung des Grenzwertes wurde verzichtet.

In gleichsinnigen Versuchen an je 2 Topfreben der Sorten Portugieser, Riesling × Silvaner und Silvaner betrug der längste Abstand zwischen Verletzung und Impfung 10 Tage. Die Anzahl der Stiche an 2 Reben schwankte zwischen 13 und 37. Nach 41 Tagen hatten an den Portugieserreben bei 10 Tagen Abstand zwischen Verletzung und Impfung noch 4,8% der Stichstellen Wucherungen gebildet, an Riesling × Silvaner bei 9 Tagen Abstand 27%, bei 10 Tagen 0%, während an den Silvanerreben keine Wucherungen entstanden waren. Trotz der geringen Zahl der Impfungen erkennt man, daß auch bei der Rebe die Infektion nicht unmittelbar nach der Verletzung zu erfolgen braucht. Die meisten Wucherungen waren an den noch grünen Teilen der Triebe entstanden.

Eine sehr umfangreiche Literatur liegt über den durch Pseudomonas tumefaciens hervorgerufenen Wurzelkropf der Obstgehölze vor (27, 62, 123, 138—146, 178, 179). Zum Vergleich wurden deshalb auch einige Impfungen an diesen vorgenommen.

2 Apfelsämlinge Nr. 235 und 264 aus dem Jahre 1928 wurden am 6. 6. 1929 je zweimal im Trieb der Jahre 1928 und 1929 durch Nadelstiche mit Stamm I geimpft. Am 3. 7. 1929 zeigten sich bei dem Sämling 235 an 3, am 25. 7. 1929 an 4 Stichstellen Wucherungen. Am 31. 8. 1931 betrugen die Durchmesser in der Reihenfolge von unten nach oben 3, 20, 12 und 25 mm. Bis zum 9. 1. 1932 hatten die 3 oberen Wucherungen 54, 36 und 43 mm Durchmesser erreicht, während der kleine Tumor an der untersten Stichstelle abgestorben war.

An dem Apfelsämling 264 war bis zum 27. 2. 1930 keine Wucherung festzustellen. Im Laufe des Sommers 1930 begann an einem Stich eine Gewebeneubildung, die bis zum 27. 7. 1930 7 mm, bis zum 31. 8. 1931 40 mm Durchmesser erreichte. Im Laufe des Sommers 1932 nahm der Tumor stark an Größe zu, so daß er am 9. 1. 1933 den Stamm bis auf etwa $^4/_5$ umschloß und seine größten Ausdehnungen 110×92×67 mm betrugen. Es lagen bei dieser Wucherung zwischen Impfung und Beginn der Entwicklung mehr als 9 Monate, wahrscheinlich nahezu 1 Jahr. Die äußeren Teile der Wucherungsgewebe starben jeweils nach Abschluß der Vegetationszeit ab, trennten sich aber nicht von den Stämmen, so daß sie auf den im nächsten Jahr neu gebildeten Tumoren als mehr oder weniger zerklüftete Gewebemassen aufsaßen.

An Johannisbeeren (Ribes rubrum), Sorten: Rote Holländische und Rote Kirsch, wurden 18 Infektionen mit Stamm I durch Anstechen vorgenommen, von denen im Laufe des Sommers nur eine zu einer Wucherung von nicht ganz Erbsengröße führte.

10 Impfungen mit demselben Stamm in Sprosse und Wurzelhals von Dahlie (Dahlia variabilis), Sämling von Herbstkönigin, hatten keinen Erfolg. Ob die geimpfte Pflanze ungeeignet war oder der benutzte Bakterienstamm ihr gegenüber eine geringe Virulenz besaß, wurde nicht weiter untersucht. Gerade an Dahlie soll nach Mehlisch (108) Wurzelkropf durch Pseudomonas tumefaciens in immer stärkerem Maße auftreten.

An einem Sproß einer Topfpflanze von Sodum Sieboldi wurden am 24. 3. 1933 etwa 1 cm im Durchmesser große, vollständig unregelmäßig gestaltete Wucherungen beobachtet. Da die eine in ihrem Innern keine tierischen Parasiten aufwies, lag die Vermutung nahe, daß es sich um eine Bakteriengalle handeln würde. Zur schnellen Orientierung wurden mit einer sterilen Nadel Stiche durch das Wucherungsgewebe ausgeführt und unmittelbar darauf mit derselben Nadel 2 Tomatenpflanzen durchstochen. An zusammen 20 Stichstellen bildeten sich im Laufe von 4 Monaten 15 Wucherungen, die den durch Reinkulturen von Pseudomonas tumefaciens hervorgerufenen vollständig glichen. Aus unberührtem Gewebe der zweiten Sedumwucherung wurden in der Zwischenzeit Bakterien gezüchtet, die ebenfalls an Tomaten Wucherungen hervorriefen, und zwar an allen Stichstellen.

Bekanntlich können durch chemische und physikalische Reize Pflanzen zu Zellteilungen angeregt werden (2, 38, 77, 117, 166). Zur Desinfektion der Nadel und der Außenseiten der Pflanzen diente häufig Alkohol, der seinerseits vielleicht als Reizmittel wirken konnte. Da die äußeren Gewebe keine Reaktion erkennen ließen, wurden je 5 Tomaten mit steriler Nadel 10 mal durchstochen und an den folgenden 8 Tagen je 12 mal in Abständen von 2 Std. auf die Stichstellen ein Tropfen 30-, 50-, 70- bzw. 90 proz. Alkohol gegeben. In allen Gruppen war in einigen Wundspalten geringe Zunahme des Markgewebes zu erkennen. Weitere Gewebeneubildungen traten jedoch nicht ein.

Mit verschiedenen Milchsäureverdünnungen (Konzentration 1 : 1 bis 1 : 3200) an Tomaten und Rizinus durchgeführte gleichsinnige Versuche blieben ohne Erfolg (9, 11, 136).

Wie zu erwarten war, haben sich an Verletzungen, die mit sterilen Geräten ausgeführt wurden, niemals Tumoren gebildet. Ob Pseud. tumefaciens bei der Entstehung von Wucherungen selbst als Reizmittel wirkt oder irgendwelche Stoffwechselprodukte die Gewebeneubildung veranlassen, ist vorläufig unentschieden (164).

4. Übertragung im Weinberg.

Manche Verff. (62, 65) und auch Winzer behaupten, die Mauke könne im Frühjahr beim Rebschnitt mit der Schere von einem Stock auf den anderen übertragen werden. Zur Nachprüfung dieser Angaben wurden folgende Versuche durchgeführt.

3 Tomaten wurden je 15 mal mit einer Nadel durchstochen, die jeweils unmittelbar vorher durch einen Tumor einer anderen Tomate gestoßen worden war. An 19 Stichstellen (= 42%) bildeten sich Wucherungen. Die gleichartige Übertragung von Rizinus auf Rizinus gelang bei 30 Stichen 0 mal, von Rizinus auf Tomate bei 60 Stichen 7 mal (= 12%), von Reben auf Tomate bei 150 Stichen 74 mal (= 50%).

Nach Lieske (88) und Stapp (180) sind auch in den abgestorbenen Wucherungen an Reben die Krankheitserreger noch lebensfähig. Dies konnte durch folgende Versuche bestätigt werden: Abgestorbene Stücke von Maukewucherungen wurden mit einer sterilen Nadel durchstochen und diese unmittelbar darauf durch einen Tomatentrieb gestoßen. Die Tumoren stammten von 7 verschiedenen Elblingstöcken. Von jedem Stück wurden auf je 3 Tomaten je 10 Übertragungen vorgenommen. Von den 210 Impfungen verliefen 23 (= 11%) positiv. Die gleichartige Übertragung auf gesunde Elblingreben gelang bei 243 Stichstellen 92 mal (= 38%).

Die Verschleppung des Maukeerregers von einer kranken auf eine artgleiche oder nicht artgleiche gesunde Pflanze durch Arbeitsgeräte ist also möglich. Im Weinberg kommt hierfür hauptsächlich der Frühjahrsschnitt in Frage. Wird eine vorjährige Wucherung beim Säubern des Stockes mit der Schere entfernt und anschließend ein gesunder Stock mit derselben Schere geschnitten, so kann eine Übertragung des Krankheitserregers in die dabei entstehenden Wunden erfolgen.

5. Eindringen und Verhalten in der Pflanze.

Nach Literaturangaben (88, 141, 158) und eigenen Versuchen aus dem Jahre 1927 vermag der Maukeerreger an unverletzten Pflanzengeweben keine Wucherungen hervorzurufen. Auch normaler Kallus (an Apfelpfröpflingen) kommt nur in besonderen Fällen als Eingangspforte in Frage (145, 161, 162).

An 4jährigen Elblingreben im Versuchsgelände der Zweigstelle der Biologischen Reichsanstalt zeigten sich im Juli 1933 etwa 10 cm über und 5 cm unter der Erdoberfläche in der Rinde etwa 1 mm breite Risse, durch die ein lockeres, weißes, sehr saftreiches Gewebe hervortrat. Nach dem Entfernen der alten, abgestorbenen Rindenstreifen und der weißen Zellschicht stieß man auf normales, junges Rindengewebe. Die Reben stehen in einem tiefgründigen, sandigen Diluviallehm, der ziemlich viel Feuchtigkeit enthielt. Die Niederschlagswerte der Monate April, Mai und Juni lagen erheblich über denen des 20jährigen Mittels (206). Die Entstehung des Gewebes hing mit dem großen Feuchtigkeitsgehalt des Erdbodens zusammen und ist von Molz in den Weinbergen Rheinhessens mehrfach beobachtet worden (36, 76, 109). Zieht man Rebenstupfer in Nährlösungen, so treten an den in der Flüssigkeit stehenden Holzteilen meistens sehr starke derartige Hypertrophien auf.

An 5 Stöcken wurde auf das junge Gewebe eine Aufschwemmung des Stammes VII gepinselt, um die Infektionsmöglichkeit festzustellen. Wuche-

rungen entwickelten sich jedoch bis zum Abschluß der Vegetationsperiode in keinem Fall. Das schwammige Gewebe starb ziemlich früh mit braunvioletter Farbe ab und zerfiel beim Abspringen der Rindenstreifen. Dieselbe Erscheinung zeigte sich an 8 weiteren Elblingstöcken, ohne daß sich Mauke an diesen entwickelte.

Nach allen bisher vorliegenden Beobachtungen sind also für das Eindringen des Maukeerregers in den Pflanzenkörper Wunden unerläßlich. Diese brauchen nicht groß und tief zu sein. Genugen doch z. B. bei Tomaten für die Infektion Verletzungen, die entstehen, wenn man mit der Fingerkuppe leicht über den Trieb hinstreift (Abb. 6)!

Nach Magnus (101) wird hauptsachlich durch Verwundung und die dadurch angeregten Neubildungsprozesse die fur die Erkrankung notwendige „Disposition" der Pflanze geschaffen. Durch Spaltoffnungen ın Pflanzen eingedrungene Bakterien erzeugen nach Patty (129) und Schmidt (158) keine Tumoren.

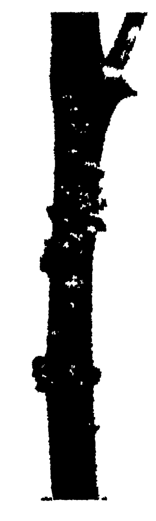


Abb. 6. Maukewucherungen an einem Tomatentrieb; Verletzungen durch Streichen mit der Fingerkuppe entstanden; infiziert mit Stamm I; etwa 1 : 1.

Die Inkubationszeit betrug bei Tomaten etwa 10, bei Pelargonien etwa 14 und bei Reben mindestens 19 Tage, im allgemeinen 3—4 Wochen. Es sind dies die am häufigsten beobachteten Zeitspannen zwischen Infektion und deutlichem Sichtbarwerden der Wucherung. Eine mindestens ebensogroße Bedeutung wie die normale hat insbesondere für Bekämpfungsversuche die längste Inkubationszeit. Sie betrug bei Vitis vinifera-Sorten: St. Laurent mehr als 281, weniger als 350, Silvaner mehr als 285, weniger als 350, Ruländer mehr als 322, weniger als 350, Portugieser mehr als 356, weniger als 418 Tage.

Bei krautigen Pflanzen ist in den meisten Fällen nach der Verletzung des Triebes mit einer Nadel ein dunkler Strich in basaler und apikaler Richtung von der Stichstelle ausgehend zu erkennen. Er wird durch den in die Interzellularräume eingetretenen Zellsaft hervorgerufen.

In diesem infiltrierten Raum breiten sich die Bakterien nach Untersuchungen von Riker (140, 141) und Ivanoff und Riker (51) aus. Hill u. a. (41, 42, 152) stellten fest, daß sich Pseud. tumefaciens in Form von Zoogloeen in den Interzellularräumen und Gefaßen von den Infektionsstellen aus verbreitet. Die Geschwindigkeit schwankte zwischen 0,029 und 0,04 mm in der Minute. Dabei bestanden direkte Beziehungen zwischen Virulenz und Bewegungsgeschwindigkeit verschiedener Tumefaciens-Stamme. Ivanoff und Riker (51) fanden für Bakterien ohne Eigenbewegung und chinesische Tusche dıe gleichen Verbreitungsverhältnisse wie fur Pseud. tumefaciens allein und mit anderen Bakterien bzw. Tusche gemischt. Physikalische Krafte spielen demnach bei der Bewegung des Maukeerregers in der Pflanze eine ausschlaggebende Rolle.

Bei Tomaten, Pelargonien und Rizinuspflanzen ist vor der Entwicklung der Tumoren häufig zunächst eine Schwellung in dem Ausmaß der infiltrierten Strecke zu erkennen. Bei Tomaten kann diese Schwellung an Größe zunehmen, ohne daß die Epidermis von dem Wucherungsgewebe durchbrochen wird. An der Stichstelle selbst tritt dann oft das wuchernde Markgewebe hervor. Da es sich aber in allen diesen Fällen um lokale Gewebeneubildungen handelt, wurde versucht, eine Verschleppung des

Krankheitserregers durch das Gefäßsystem der Versuchspflanzen herbeizuführen. Bakterien werden aus einer Suspension durch den Transpirationsstrom wohl in abgeschnittene Sprosse eingesaugt, aber im allgemeinen nicht höher als 6 mm, weil in den Tracheen eine Filtration stattfindet. Nur ausnahmsweise steigen einzelne Keime 6—8 cm hoch empor (7, 116). In eigenen Versuchen konnte eine „Gesamterkrankung" der behandelten Pflanzen ebenfalls nicht erreicht werden.

Je 2 Pelargoniensteckling wurden bis zur Kallusbildung (119) in eine wässerige Aufschwemmung der Stämme I bzw. II gestellt. An den später in der Erde stehenden Schnittflächen entwickelten sich im Laufe der nächsten 8 Monate Wucherungen bis zu 44 mm Durchmesser. Außerdem entstanden aber auch seitlich an den Sprossen bis zu einer Höhe von 38 mm oberhalb der Schnittflächen Wucherungen, die einen Durchmesser von 20 mm aufwiesen. Während der Behandlung der Stecklinge waren Verletzungen sorgfältig vermieden worden.

Weiterhin wurden an 2jährigen Pelargonien je 1 oder 2 Gipfel abgeschnitten und auf die Stümpfe mit Hilfe von Gummischläuchen Glasröhren aufgesetzt. In diese kamen je 2 ccm einer Bakterienaufschwemmung der Stämme I bzw. II. Nach verschieden langen Zeiträumen war die Flüssigkeit durch die Triebstümpfe eingesaugt worden. Es wurden dann noch weitere 2 ccm Leitungswasser in die Glasröhren nachgefüllt und ebenfalls mehr oder weniger weitgehend von den Pflanzen aufgesaugt. Die Glasröhren blieben 6 Tage auf den Trieben stehen. In der Folgezeit bildeten sich nur an den Schnittflächen Wucherungen. In einem Fall entstand auch 10 mm unterhalb der Wundfläche an einer alten Blattnarbe eine langsam durchbrechende Wucherung. Eine äußerliche Verletzung konnte an der betreffenden Stelle nicht festgestellt werden.

Es ist möglich, daß der Anstoß zur Bildung der Wucherungen an den Sprossen von Krankheitserregern ausging, die sich von den Schnittflächen her in den Pflanzen ausgebreitet hatten. Eine Verseuchung des ganzen Pflanzenkörpers war in keinem Falle eingetreten; denn an Stichverletzungen, mit sterilen Nadeln durch die äußerlich mit Alkohol abgeriebenen Triebe etwa 2 cm unterhalb der Schnittflächen ausgeführt, bildeten sich niemals Wucherungen. Die Pelargonien waren vor der Behandlung zum Teil längere Zeit trockengehalten worden. Ein Unterschied zwischen diesen und den normal gegossenen zeigte sich in bezug auf Ausbildung der Wucherungen nicht. Zum Vergleich dienten in derselben Weise behandelte Pelargonien, bei denen statt der Bakterienaufschwemmung Leitungswasser in die Glasröhren gegeben wurde. Wucherungen entstanden an diesen Pflanzen nicht.

Wenn in einigen Arbeiten gesagt wird, daß bei Pflanzen Tumorstränge auftreten, durch die eine Verschleppung der Krankheit im Pflanzenkörper stattfindet, so handelt es sich also höchstwahrscheinlich um mechanische Verbreitung des Erregers innerhalb des Pflanzengewebes z. B. durch Längenwachstum des infizierten Teiles oder durch Eigenbewegung über kurze Strecken innerhalb der Gefäße oder im Zellsaft, der nach der Verletzung die Zwischenzellräume ausfüllt (82, 130, 139—141, 152, 158, 172, 174, 175).

An Bogreben entstehen durch das Biegen und gleichzeitige Drehen beim Binden leicht Spannungen bzw. Zerreißungen in der Richtung der Markstrahlen. Liegen in der Nähe Wucherungskerne, so dringt von diesen aus Tumorgewebe in die Spalten bzw. gespannten Gewebeteile vor und bildet „Wucherungsleisten" (Abb. 7). In einigen Fällen erstreckten sich

die Wucherungen über die gesamte behandelte Fläche des Zielholzes (Abb. 1). Umwucherte Augen trieben meist nicht aus.

Ein einfaches Bestreichen frischer Schnittflächen gekappter krautiger Pflanzen führte nahezu regelmäßig zur Bildung von Wucherungen an den Wundflächen. Oft wurden nur einzelne Gewebeteile zu Neubildungen angeregt, z. B. bei Tomaten nur das Mark oder nur das Rindengewebe, oder aber es entstanden Wucherungen gleichmäßig über die gesamte Schnittfläche verteilt. Nach Jacovljevic (52) reagieren Kambium und Mark auf eine Verletzung am schnellsten durch Zellteilung.

Bei Reben besteht kurz vor dem Austrieb ein erheblicher Überdruck (Blutungsdruck) in den Gefäßen. Werden zu dieser Zeit Stiche bzw. Schnitte mit infizierten Nadeln oder Skalpellen angebracht, so tritt der Blutungssaft mehr oder weniger heftig aus und kann wahrscheinlich zu einer Auswaschung der Bakterien führen. So dürfte der negative Verlauf von rund 200 Impfungen, die im Frühjahr 1928 an Rebstöcken im Weinberg vorgenommen wurden, zu erklären sein. Die Reben standen zu der Zeit unter so hohem Blutungsdruck, daß nach der Verletzung der Saft in rascher Tropfenfolge aus den Wunden austrat. Die zu den Impfungen benutzten Kulturen hatten an Tomaten 100 proz. Befall hervorgerufen. Wenn nun auch, wie an anderer Stelle angegeben, zwischen Tomaten und Reben ein großer Anfälligkeitsunterschied besteht, so hätte doch die eine oder andere Impfung positiv verlaufen müssen, zumal derselbe Stamm in anderen Versuchen an Reben Befall hervorrief.



Abb. 7. Wucherungsleiste an 2jähr. Holz von W. Burgunder zwischen zwei durch Infektion des 1jähr. Holzes mit Stamm VII hervorgerufenen Wucherungen; 1 : 1.

Wasserhaushalt und Ernährungszustand spielen bei stark anfälligen Pflanzen wie Pelargonien und Tomaten keine ausschlaggebende Rolle für die Infektion. Pelargonien konnten noch mit Erfolg infiziert werden, nachdem sie so lange trocken gehalten worden waren, daß die größten während der Trockenperiode gewachsenen Blätter einen Durchmesser von nur noch 2—3 cm hatten. Der Beginn der Wucherung setzte zur selben Zeit ein, wie bei normal gegossenen Pflanzen, nur war die weitere Entwicklung dem Gesamtwachstum der auch während und nach der Impfung trockengehaltenen Pflanzen entsprechend langsam. Mit Tomaten wurden Versuche angestellt, bei denen verschiedene Ernährungs- und Wachstumsstörungen einerseits und Infektion mit dem Maukeerreger anderseits zusammenwirkten. Die Tomaten standen in Töpfen, die in der einen Gruppe mit Grubensand, in der anderen mit guter Pflanzerde gefüllt waren. In beiden Gruppen wurde Reihe 1 alle 8 Tage mit einer 0,2 proz. Lösung von Harnstoff-Kali-Phosphor BASF gedüngt, Reihe 2 zu Beginn des Versuches gegipfelt, Reihe 3 entblättert und Reihe 4 nur normal gegossen. In allen diesen Fällen bildeten sich an sämtlichen Stichstellen (in jeder Reihe 100) Wucherungen, so daß irgendwelche Befallsunterschiede nicht festgestellt werden konnten. Die Pflanzen mit bestem Wachstum bzw. bester Ernährung bildeten die größten Tumoren.

Wenn von einem Maukeherd aus eine Verseuchung der ganzen Pflanze stattfände, so müßten bei neuen Verletzungen auch neue Wucherungen entstehen. Es ist dies aber, wie bereits oben gesagt wurde, niemals der Fall gewesen, vorausgesetzt, daß sich die neuen Wunden nicht in unmittelbarer Nähe der bereits bestehenden Krankheitsherde befanden und so durch Gewebezerreißungen Verbindungen entstanden, in welche die Tumorzellen hineinwachsen konnten.

Die Forderung, von maukekranken Stöcken kein Setzholz zu nehmen, erscheint daher nicht berechtigt, sofern sich nicht in unmittelbarer Nähe der Schnittstelle eine Wucherung befindet (62, 65).

In Mikrotomschnitten einer spontan entstandenen Maukewucherung eines Rieslingstockes konnten intrazelluläre, bakterienartige Gebilde festgestellt werden. Ob es sich hier wirklich um Pseudomonas tumefaciens handelte, ließ sich mit Sicherheit nicht entscheiden. Der Beweis für das Vorkommen des Erregers in den Tumoren konnte dagegen durch die Isolierung der Bakterien aus den Wucherungsgeweben und Infektionen mit beiden erneut geliefert werden. Nach Literaturangaben kommt Pseudomonas tumefaciens in Tumoren inter- und intrazellular vor und zwar hauptsächlich nahe der Oberfläche, weiter im Innern nur spärlich oder nicht mehr. In manchen Fällen konnten in ganzen Wucherungen keine Bakterien nachgewiesen werden (4, 88, 103—106, 118, 135, 138—141, 158, 164, 168, 171, 175, 177, 193). Ob durch Pseud. tumefaciens hervorgerufene Tumoren auch ohne dauerndes Vorhandensein des Erregers weiterwachsen können, oder ob derselbe in eine mikroskopisch nicht feststellbare Form überzugehen vermag, ist noch nicht entschieden, erscheint jedoch nach den Ergebnissen von Rosen (153), Stapp und Bortels (182) sowie Schätzel (156) unwahrscheinlich.

6. Verhalten im Erdboden.

Aus abgestorbenen Wucherungen gelangen die Bakterien durch abgefallene Stücke und wahrscheinlich auch durch Regenwasser in den Weinbergsboden, um von hier aus wieder in frische Wunden an Reben übertragen zu werden. Muß diese Neuinfektion bald erfolgen, oder wie lange bleiben die Bakterien in den abgestorbenen Wucherungen bzw. im Boden lebensfähig? Die Übertragung des Maukeerregers von abgestorbenen vorjährigen Wucherungen an Freilandreben auf Tomaten gelang im Mai 1933. Da die Tumoren im allgemeinen im November absterben, hatten sich die Bakterien also etwa 6 Mon. in den toten Geweben am Leben erhalten.

Nach Untersuchungen von Patel (128) beträgt die Lebensdauer von Pseud. tumefaciens in sterilisiertem Erdboden im Laboratorium bis zu 736, in nicht sterilisiertem 539—669 Tage. Frühere Versuche desselben Verf.s, bei denen Glasröhren mit beimpftem Ton, Lehm und Sand von Oktober bis März im Erdboden vergraben worden waren, ergaben als längste Lebensdauer auf Sand 16, auf Ton und Lehm 14 Monate (126, 127). Muncie (115) erhielt an Tomaten noch typische Wucherungen, wenn er Wunden mit Erde bestrich, die vor 102 Tagen infiziert worden war. Nach Banfield (4) kann der Maukeerreger in nicht sterilisierten Böden einige Monate bis über 1 Jahr leben.

Da die Lebensbedingungen für die Bakterien in Glasröhren wesentlich andere sind als im Freiland, mußte angestrebt werden, die Lebensdauer in einer den natürlichen Verhältnissen ähnlicheren Weise zu prüfen. Es wurden je 20 Stecklingstöpfe mit Sand gefüllt und mit Stecklingen aus Tomatengipfeltrieben besetzt, bei denen am unteren Ende zur Vergrößerung der Wundfläche 2 je etwa 2 cm lange Längsschnitte angebracht worden waren.

Die Herstellung der Stecklinge erfolgte auch für die späteren Versuche in der gleichen Weise. Bei der ersten Gruppe wurden auf den Sand 24 Std. vor dem Einbringen der Stecklinge je 10 ccm einer wässerigen Aufschwemmung von Stamm I, bei der zweiten gleich nach dem Besetzen an die Stecklinge, bei der dritten an den Topfrand gegossen. Bei der vierten aus 40 Töpfen bestehenden Gruppe kam statt des Sandes Weinbergsboden (Berncasteler Pfalzgraben), der durch ein 1-cm-Sieb geworfen worden war, zur Anwendung. Die Bakterienaufschwemmung floß beim Aufgießen über die ganze Oberfläche und zog erst in etwa 10 Min. in den Boden ein. Zum Vergleich dienten 50 unbehandelte Töpfe mit Weinbergsboden und 57 mit Sand. Bei der nach 54 Tagen vorgenommenen Nachschau hatten in der ersten und zweiten Gruppe sämtliche Stecklinge am Fußende deutliche Maukewucherungen, in der dritten 70%, in der vierten 88% (Abb. 8). Hierauf wurden die Töpfe der verschiedenen Gruppen mit dem gebrauchten Sand bzw. Weinbergsboden wieder gefüllt und in derselben Weise wie im ersten Fall mit Tomatenstecklingen besetzt, ohne daß eine neue Beimpfung des Bodens erfolgte. 73 Tage später hatten beim Austopfen in der ersten Gruppe von 20 Stecklingen 5%, in der zweiten von 19 16%, in der dritten von 17 18% und im Weinbergsboden von 47 26% Wucherungen. Da die Befallsprozente noch immer verhältnismäßig hoch lagen, folgte ein dritter Satz von Stecklingen, bei dem die beimpften 3 Sandproben, die durch Verluste beim Austopfen kleiner geworden waren, zusammen 32 Töpfe füllten. Der Weinbergsboden reichte noch für 45 Töpfe aus. 47 Tage später trugen 19% der Tomatenstecklinge im Sand Wucherungen, während im Weinbergsboden sämtliche Pflanzen gesund geblieben waren. Mit beiden Böden wurde ein vierter Versuch angesetzt. Bei der nach 46 Tagen erfolgten Nachschau hatten sich weder an den Stecklingen im Sand noch an denen im Weinbergsboden Wucherungen gebildet. Die letzten Infektionen waren also im Sand noch nach 127, im Weinbergsboden nach 54 Tagen erfolgt, während nach 171 im Sand und nach 127 im Weinbergsboden keine Infektion mehr eingetreten war. Die Lebensdauer der Bakterien endete also im Sand zwischen 127 und 171, im Weinbergsboden zwischen 54 und 127 Tagen. Die Tomatenstecklinge hatten im Gewächshaus bei 20—30° gestanden und waren normal gegossen worden. In 57 Vergleichstöpfen mit nicht infiziertem Sand und in 50 mit nicht infiziertem Weinbergsboden hatten sich keine Wucherungen gebildet.



Abb. 8. Maukewucherung am Fußende eines angeschnittenen und in mit Stamm I infizierten Sand gesetzten Tomatenstecklings; 1 : 1,3.

Da in den Devonschieferböden der Mittel- und Untermosel bedeutend weniger maukekranke Stöcke zu finden sind als im Triaskalkverwitterungsboden der Obermosel, erschien es wünschenswert, die Lebensdauer des Maukeerregers im Weinbergsboden der Obermosel zu untersuchen. Es wurden deshalb 65 Töpfe mit Weinbergsboden aus Temmels a. d. Obermosel gefüllt und in der oben beschriebenen Weise mit Tomatenstecklingen besetzt. Wegen des Vorkommens der Reblaus in anderen Gemarkungen an der Obermosel erschien besondere Vorsicht angebracht. Der Boden wurde deshalb, obgleich er aus reblausfreier Gemarkung stammte, 1 Std. auf 140° erhitzt und in sterilisierte Töpfe gefüllt. 50 Töpfe erhielten 24 Std. später einen Zusatz von 10 ccm einer Aufschwemmung von Pseud. tumefaciens, während 15 zum Vergleich mit 10 ccm Leitungswasser begossen wurden.

Nach 60 Tagen lebten von der ersten Gruppe noch 25, von denen 20% am Fußende Wucherungen trugen, während die noch lebenden 11 Vergleichspflanzen gesund waren. Da infolge der für Stecklingsvermehrung ungünstigen Jahreszeit viele Pflanzen eingegangen und der Prozentsatz der erkrankten Pflanzen für die erste Besetzung der infizierten Erde sehr niedrig war, wurde der Versuch wiederholt.

Von 52 Töpfen mit Tomatenstecklingen erhielten 38 eine Impfung wie in den früheren Versuchen an den Topfrand, 14 blieben unbeimpft. Nach 69 Tagen waren die Tomaten im infizierten Boden zu 63,2% erkrankt, im nichtinfizierten sämtlich gesund. Am folgenden Tage wurde der infizierte Boden mit 34 neuen Stecklingen besetzt, die sich bei der nach 68 Tagen erfolgten Nachschau sämtlich als gesund erwiesen. Die in großer Menge in den Boden gebrachten Bakterien hatten denselben also nicht 69 Tage lang infektionsfähig erhalten.

Zusammenfassend kann gesagt werden: Infektionen traten noch ein im Sand nach 127 Tagen, im Devonschieferboden nach 54 Tagen, im sterilisierten Kalkboden nicht mehr nach 69 Tagen. Die Befallsprozente der Tomaten waren

im Sand nach 0 Tagen 90%, nach 54 Tagen 13%, nach 127 Tagen 19%, nach 173 Tagen 0%;

im Weinbergsboden (Schiefer) nach 0 Tagen 88%, nach 54 Tagen 26%, nach 127 Tagen 0 %;

im Weinbergsboden (Kalk, Obermosel) nach 0 Tagen 63%, nach 69 Tagen 0%.

Lebensdauer des Bakteriums und Befallsprozente der Tomaten waren demnach im Sand am höchsten, im Schieferboden geringer und im Kalkverwitterungsboden der Obermosel am geringsten. Der Vergleich der Versuche wird allerdings dadurch beeinträchtigt, daß sie aus arbeitstechnischen Gründen zu verschiedenen Zeiten angesetzt werden mußten und die Sterilisation eines Bodens notwendig war.

Wenn nun im Obermoselgebiet trotzdem mehr Maukestöcke zu finden sind als an der Mittelmosel, so gibt es dort auch zahlreichere Weinberge, die unter stauender Nässe, Frösten und Hagelschäden zu leiden haben, während dies an den Mittelmoselhängen nur selten der Fall ist. Außerdem wird an der Mittelmosel Riesling gebaut, an der Obermosel Elbling, der bei gleichen Standortsbedingungen meistens häufiger an Mauke erkrankt.

V. Sortenanfälligkeit und Virulenzunterschiede.

In den bisher behandelten Infektionsversuchen war meistens Stamm I benutzt worden. Bei Parallelimpfungen zeigten verschiedene Stämme ab-

weichende Virulenz. Diese erwies sich als ausschlaggebender Faktor für den Erfolg einer Impfung, während die Anfälligkeit der Rebsorten sowie Ort und Zeit der Impfung eine weniger wichtige Rolle spielten. Zum Beweis hierfür sollen Versuche angeführt werden, in denen mehrere Rebsorten unter gleichen Bedingungen mit verschiedenen Tumefaciens-Stämmen geimpft wurden. Die Freilandreben standen im Versuchsgelände beim Dienstgebäude innerhalb des Sortiments wirtschaftlich wichtiger Rebsorten. Dieses umfaßt je 18 Stöcke folgender Sorten: Frühburgunder, Spätburgunder, Weißer Burgunder, Roter Elbling, Weißer Elbling, Färbertraube, Weißer Gutedel, St. Laurent, Müllerrebe, Portugieser, Riesling, Riesling × Silvaner, Ruländer, Silvaner, Trollinger. Zu den Versuchen mit Topfreben wurden nach Möglichkeit dieselben Sorten verwendet.

Tab. 1. Infektionsversuch an Zielholzern, Bogreben und Schenkeln von Freilandreben und jungen Trieben von Topfreben zur Feststellung von Anfalligkeits- und Virulenzunterschieden.

Freilandreben	Befall in % nach Infektion mit Tumefaciens-Stamm								
	I			VI			VII		
	Zielholz	Bogrebe	Schenkel	Zielholz	Bogrebe	Schenkel	Zielholz	Bogrebe	Schenkel
Frühburgunder .	0	0	—	100	70	—	100	100	—
Spätburgunder. .	0	40	0	100	100	30	100	100	100
W. Burgunder . .	0	10	—	100	100	—	90	100	—
R. Elbling. . . .	10	—	—	100	90	—	100	100	—
W. Elbling . . .	20	20	—	100	100	—	100	100	100
Farbertraube . .	0	10	—	60	80	—	100	100	—
W. Gutedel . . .	0	0	10	100	90	—	100	100	100
St. Laurent . . .	10	10	100	100	100	100	100	—	100
Müllerrebe . . .	0	0	10	100	90	100	100	100	100
Portugieser . . .	0	—	—	100	100	—	100	100	—
Riesling	10	0	10	100	100	100	100	100	100
Riesling × Silvaner	80	20	—	100	100	—	100	100	—
Ruländer	0	0	0	100	100	—	100	100	100
Silvaner.	10	0	—	100	90	—	100	100	—
Trollinger	0	20	—	100	100	—	100	100	—
Gesamtbefall:	9,3	10	21,7	97,3	94	82,5	99,3	100	100

Topfreben	Anzahl d. Stiche	Befall	Anzahl d. Stiche	Befall	Anzahl d. Stiche	Befall
W. Elbling . . .	100	36	190	95	194	98
Riesling	99	17	200	97	200	100
Riesling × Silvaner	94	96	200	99	200	100
Insgesamt:	293	48,5	590	97	594	99

In Tab. 1 sind die Befallsprozente aus 3 Versuchen mit 3 Tumefaciens-Stämmen zusammengestellt und zwar:

1. Impfungen in dies- und vorjährige Triebe (Zielhölzer bzw. Bogreben) von 15 Rebsorten. Versuchsdauer 2. 6. bis 4. 10. 1932;
2. Impfungen in 7jähriges Holz (Schenkel). Mehrere Rebsorten mußten hierbei ausgelassen werden, weil keine geeigneten Stöcke zur Verfügung standen. Versuchsdauer 18. 7. bis 20. 9. 1933;
3. Impfungen in diesjährige Triebe von Topfreben im Gewächshaus. Versuchsdauer 6. 7. bis 19. 11. 1931.

Bei 1. und 2. wurden die Internodien aller behandelten Rebteile je 10 mal durchstochen oder, wenn dieses wegen der Dicke des Holzes nicht möglich war, tief angestochen. Bei 3. ist die jeweilige Anzahl der Stiche durch die Internodien in der Tabelle angegeben. Anfälligkeitsunterschiede sind aus den angegebenen Werten mit Sicherheit bei keinem der 3 Stämme abzulesen. Dagegen zeigen diese untereinander erhebliche Abweichungen in ihrer Wirkung. Während die Befallsprozente bei I in allen Fällen am geringsten sind, liegen dieselben bei VI und VII bedeutend höher und erreichen sehr oft, bei VII fast immer, 100. Da das benutzte Rebenmaterial in allen Parallelversuchen einheitlich war, die Behandlung in gleicher Weise erfolgte und auch die Temperatur und Feuchtigkeit im Gewächshaus annähernd gleichartig gehalten werden konnten, sind die Verschiedenheiten in der Wirkung der 3 Stämme auf Unterschiede in ihrer Virulenz zurückzuführen. Dieselbe war bei I am geringsten, bei VII am stärksten, bei VI annähernd ebenso stark.

Führt man an noch nicht ausgewachsenen diesjährigen Rebtrieben Impfungen an den einzelnen Internodien aus, an der Basis des Triebes beginnend bis zum Gipfel, soweit ein Durchstechen des jungen Gewebes technisch noch möglich ist, so bilden sich nach Impfungen an den 15 Sortimentsrebsorten die stärksten Wucherungen nicht an den jüngsten Gewebeteilen, sondern es ist zwischen Größe der Wucherungen und Alter des geimpften Internodiums keine bestimmte Gesetzmäßigkeit festzustellen. In einigen Fällen entstanden die größten Wucherungen im unteren, in anderen im oberen Teil der Triebe.

Tab. 2. Infektionsversuche an verschiedenen Pflanzen zur Feststellung ihrer Anfälligkeit sowie der Virulenz verschiedener Tumefaciens-Stämme.

Versuchspflanze	Tumefaciens-Stamm													
	I		IV		V		VI		VII		II		III	
	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %	Impfzahl	Wuch. %
Tomato	80	98	80	100	80	98	80	90	80	100	80	99	80	99
Pelargonium . .	8	85	7	71	6	100	5	0	6	50	8	100	7	100
Begonia	26	23	25	36	28	22	26	8	25	0	26	24	25	30
Riesling (Topfreb.)	90	1	90	4	70	0	90	14	98	25	90	3	80	0
Frühburgunder .	90	1	10	0	10	0	60	70	50	100				
Spätburgunder .	90	1	10	0	10	20	50	84	60	75				
W. Burgunder . .	150	1	10	10	10	0	60	68	70	84				
R. Elbling . . .	90	1	10	0	10	20	60	85	50	100				
W. Elbling . . .	110	6	10	40	10	30	60	77	60	93				
Färbertraube . .	130	1	10	0	10	0	60	47	60	70				
W. Gutedel . . .	90	7	10	0	10	10	60	70	60	97				
St. Laurent . . .	90	4	10	70	10	10	60	75	60	83				
Müllerrebe . . .	90	1	10	10	10	20	60	75	60	78				
Portugieser . . .	70	0	10	10	—	—	50	100	40	65				
Riesling	90	2	10	0	10	0	60	80	60	80				
Riesling × Silvaner	100	17	10	0	10	10	60	78	60	90				
Ruländer	90	4	10	0	10	10	60	78	60	87				
Silvaner.	90	2	10	0	10	0	60	43	60	77				
Trollinger	90	4	10	0	10	0	60	95	60	85				

Auch bei völliger Vegetationsruhe der Reben entscheidet die Virulenz des benutzten Bakterienstammes über den Verlauf der Infektion. 41 Impfungen, am 27. Jan. 1933 bei einer Temperatur in der Wetterhütte von 0,3°, am Erdboden — 2,0° mit Stamm I an den Rebsorten Riesling × Silvaner, W. Elbling und Trollinger ausgeführt, verliefen sämtlich negativ, 35 mit Stamm VII an W. Elbling und Trollinger vorgenommen zu 100% positiv.

Zur weiteren Klärung der Virulenz- bzw. Anfälligkeitsfrage wurden mit 7 Bakterienstämmen im Gewächshaus an Tomaten, Pelargonien, Begonien und Rieslingtopfreben sowie mit 5 Stämmen im Freiland an 15 Rebsorten Impfungen ausgeführt. Das Ergebnis ist in Tab. 2 zusammengestellt.

Bei Tomaten, Pelargonien und Begonien wurden die Impfungen zur gleichen Zeit vorgenommen. Bei den Rebsorten sind jedoch mehrere Versuche zusammengefaßt, soweit sie unter gleichen Bedingungen durchgeführt worden waren. Ein Vergleich der Wirkung der einzelnen Stämme auf dieselbe Rebsorte ist also nur bedingt möglich, während die Pathogenität eines Bakterienstammes den 15 Rebsorten gegenüber ohne weiteres verglichen werden kann, da die Impfungen innerhalb der einzelnen Versuche gleichzeitig erfolgten.

Gegenüber Tomatenpflanzen verhielten sich die 7 Bakterienstämme verhältnismäßig gleich. Die Befallsprozente schwankten zwischen 90 und 100.

An Pelargonium zonale wurden nur wenige vergleichbare Impfungen ausgeführt. Bei diesen schwankten die Erfolge zwischen 0 und 100%. 0% lieferte Stamm VI, der auch gegenüber Tomaten am wenigsten virulent war.

Begonia semperflorens ist für Impfungen mit Pseud. tumefaciens ein wenig günstiges Objekt (47, 59, 176). Die Befallsprozente bewegten sich bei ihr zwischen 0 und 36.

Die höchsten und niedrigsten Infektionswerte der einzelnen Stämme entfallen auf verschiedene Rebsorten, von denen sich keine bezüglich der Größe und Entwicklungsgeschwindigkeit der Wucherungen regelmäßig auszeichnete. Da die geimpften Reben in einer Parzelle unter gleichen Boden- und Klimaverhältnissen stehen, kann man folgern, daß eine Rebsorte mehreren Tumefaciens-Stämmen gegenüber verschieden anfällig ist (34, 125), aber ein Tumefaciens-Stamm bei hinreichend vielen Impfungen auf die einzelnen Rebsorten eine ziemlich gleichmäßige, seiner Virulenz entsprechende Wirkung ausübt. Es kann also auf Grund von Impfversuchen mit einem Bakterienstamm die Anfälligkeit von Rebsorten nicht geprüft werden. Dazu wären Impfungen unter gleichen ökologischen und experimentellen Bedingungen mit einer möglichst großen Anzahl von Tumefaciens-Stämmen aus verschiedenen Weinbaugebieten erforderlich.

VI. Beeinflussung der Anfälligkeit.

1. Zeitpunkt der Infektion.

Aus den am 16. März 1931 mit infizierter Nadel an Rebsorten des Sortiments mit Stamm I, der benutzt wurde, weil nur er von den zu der Zeit vorhandenen aus einer Wucherung an Rebe stammte, vorgenommenen 830 flachen und tiefen Stichen in Internodien und Knoten von Zielhölzern und in mehrjähriges Holz gingen wahrscheinlich infolge der auf S. 132 erörterten Abspülung der Bakterien durch den Blutungssaft nur 8 (nicht ganz 1%) Wucherungen hervor.

Da der geringe Erfolg schon nach einigen Wochen vorauszusehen war, wurde der Versuch am 4. Juli 1931 an Topfreben ebenfalls mit Stamm I wiederholt. In der Auswahl der Sorten mußte eine kleine Änderung eintreten, weil nicht alle Sortimentsreben in Töpfen vorhanden waren. Beim Impfen wurden die Internodien mit einer Nadel durchstochen. Die normal gegossenen Reben standen im Gewächshaus bei reichlicher Lüftung. Das am 19. Nov. 1931 vorliegende Versuchsergebnis ist in Tab. 3 zusammengestellt. Die Befallsprozente schwankten zwischen 14 und 96 bei Trollinger bzw. Riesling × Silvaner.

Tab. 3. Infektionsversuch an Topfreben zur Feststellung der Maukeanfälligkeit verschiedener Rebsorten im Zusammenhang mit dem Infektionszeitpunkt (s. Text).

Rebsorte	Anzahl der Pflanzen	Anzahl der Stiche	Befall in %
Frühburgunder	10	76	22
Spätburgunder	10	98	24
W. Burgunder	—	—	—
R. Elbling	10	62	24
W. Elbling	10	100	36
Färbertraube	20	190	39
W. Gutedel	10	76	67
St. Laurent	10	63	32
Müllerrebe	—	—	—
Portugieser	10	92	18
Riesling	10	99	17
Riesling × Silvaner	10	94	96
Goldriesling	20	144	56
Ruländer	10	58	16
Silvaner	—	—	—
Trollinger	20	200	14

Tab. 4. Infektionsversuch an Freilandreben zur Feststellung von Anfälligkeitsunterschieden unter Berücksichtigung verschieden langer Beobachtungsdauer.

Rebsorte	Befall in % nach Tagen 32	68	230	346	374	439
Frühburgunder	0	0	0	0	10	20
Spätburgunder	0	0	0	10	10	10
W. Burgunder	10	10	10	20	30	30
R. Elbling	0	0	0	10	10	10
W. Elbling	0	0	0	0	0	0
Färbertraube	0	0	0	0	0	0
W. Gutedel	0	0	0	0	10	10
St. Laurent	0	0	0	0	0	0
Müllerrebe	10	10	10	10	10	10
Portugieser	0	0	0	50	70	90
Riesling	0	0	0	0	0	0
Riesling × Silvaner	50	50	50	50	50	50
Goldriesling	—	—	—	—	—	—
Ruländer	10	10	10	10	10	10
Silvaner	0	0	0	0	0	0
Trollinger	0	10	10	20	40	40

Ein wesentlich anderes Ergebnis brachte ein Infektionsversuch mit Stamm I, bei dem am 23. Juli 1931 jeweils ein Zielholz der 15 Rebsorten 10 Nadelstiche durch die Internodien erhielt. Tab. 4 enthält die nach 6 verschiedenen Zeitabständen ausgezählten Befallsprozente. Es soll gleichzeitig gezeigt werden, daß bei Maukeinfektionsversuchen an Reben noch nach längerer Zeit, wenigstens 2 Jahre hindurch, Überprüfungen der Ergebnisse vorgenommen werden müssen. Die Befallsprozente bewegen sich hier zwischen 0 bei mehreren Rebsorten und 90% bei Portugieser.

Zeigten diese Versuche bereits, daß eine Infektion zur Zeit starken Wachstums aussichtsreich ist, so geht dies noch deutlicher aus den in Tab. 5 wiedergegebenen Ergebnissen eines Reihenversuches hervor, in dem je 10 Topfreben der Sorten W. Elbling und Riesling × Silvaner in Abständen von 14 Tagen geimpft wurden. Die Reben standen im Gewächshaus, das während der kalten Jahreszeit auf 18—20° geheizt wurde. Der Versuch mußte unterbrochen werden, weil viele der vorgetriebenen Reben durch Fraß von Dickmaulrüßlerlarven zugrunde gingen und Ersatzreben nicht in genügender Menge zur Verfügung standen. Die Elblingreben blieben wegen der Fraßbeschädigung von Anfang April ab im Trieb zurück und erreichten auch später infolge von Befall durch Rote Spinne nicht mehr dieselbe Triebstärke wie im März. Der Riesling × Silvaner wuchs am kräftigsten im Juli.

Tab. 5. Einfluß der Wachstumsstärke auf die Infektion.

Geimpft am	Weißer Elbling		Riesling × Silvaner	
	Anzahl der Stiche	Befall %	Anzahl der Stiche	Befall %
21. 2.	40	3	50	18
4. 3.	25	4	50	24
19. 3.	35	46	45	18
4. 4.	107	27	102	30
1. 7.	—	—	150	56
7. 7.	164	27	—	—
16. 7.	138	19	146	45
4. 8.	135	4	149	30
15. 8.	138	0	151	3
1. 9.	122	0	140	0
17. 9.	118	0	146	0

Bekanntlich bestehen zwischen Temperatur und Wachstum enge Beziehungen. Infolgedessen hat die Temperatur auch einen gewissen Einfluß auf den Verlauf von Maukeinfektionen, wie aus folgendem Versuch ersichtlich. 15 gleich starke und gleich alte Rieslingtopfreben wurden durch Nadelstiche mit Stamm I infiziert und darauf 5 Topfreben in einem Gewächshaus aufgestellt, das vom Tage vor bis zum Tage nach der Behandlung eine Durchschnittstemperatur von 18,8° hatte. Die restlichen 10 standen in einer anderen Abteilung bei einer Temperatur von 16,6°. 5 von ihnen wurden trocken gehalten und 5 mit Harnstoff-Kali-Phosphor BASF in der normalen Weise gedüngt. Nach 6½ Mon. wies die erste Gruppe an 19 Stichstellen 12 Wucherungen (63%), die zweite Gruppe an 17 Stichstellen 3 Wucherungen (18%), die dritte Gruppe an 21 Stichstellen 4 Wucherungen (19%) auf. Der weitaus höchste Befall trat also an den bei höherer Temperatur gehaltenen Reben ein. Dieser Erfolg ist wahrscheinlich weniger auf die Tem-

peratur selbst zurückzuführen, als vielmehr darauf, daß die Reben im warmen Haus ein besseres Wachstum zeigten als die im kühlen. In den Versuchen Rikers (142, 143) entwickelten sich Tumoren gut zwischen 14 und 28° C.

Die Infektion dürfte also bei Reben und wohl auch anderen Gehölzen zur Zeit des Saftanstiegs im Frühjahr kaum erfolgen, gelingt aber sonst am besten zur Zeit des kräftigsten Wachstums. Sie ist allerdings auch im Herbst und Winter möglich, tritt aber dann später in Erscheinung, weil zwischen dem Wachstum der Tumoren und dem der Pflanze enge Beziehungen bestehen.

2. Ernährung.

Da im Weinberg Zusammenhänge zwischen den durch Frost- und Hagelschäden bedingten Wachstumsstockungen und dem Auftreten der Mauke bestehen, wurde versucht, Infektion und Entwicklungsstörung gleichzeitig auf die Versuchsobjekte wirken zu lassen.

Die experimentelle Nachahmung von Frösten war technisch nicht durchführbar. Es wurden daher Wachstumsstockungen an Topfreben durch starken Rückschnitt hervorgerufen, ähnlich den Folgen eines starken Hagelschlages. Um gleichzeitig die Wirkung des Ernährungszustandes der Reben auf die Entstehung der Mauke zu prüfen, wurde der Versuch in der aus Tab. 6 ersichtlichen Weise am 16. Juli 1928 an je 24 Riesling-Topfreben angesetzt.

Tab. 6. Einfluß der Ernährung auf die Infektion von Riesling-Topfreben.

Reihe	Wasserzufuhr	Düngung	%-Zahl der nach 4 Mon. Wucherungen zeigenden Impfstellen
1	sehr trocken	keine	8,4
2	normal		13,4
3	sehr feucht		15,1
4	normal	Harnstoff BASF 1 g/l 1 Mai bis Juli einmal, August bis Oktober zweimal wöchentlich	8,8
5	sehr feucht		34,6
6	normal	Harnstoff-Kali-Phosphor BASF 2 g/l 1 wie Reihe 4	15,8
7	sehr feucht		37,8
8[1]	sehr feucht		87,7

[1]) Reihe 8 unmittelbar vor der Impfung um etwa 1 m zurückgeschnitten.

Mauke tritt also mit großer Wahrscheinlichkeit auf, wenn Infektion, guter Ernährungszustand und Wachstumsstockung zusammentreffen.

3. Blüten- und Fruchtbildung.

Nach Stapp und Bortels (181) wirkt bei *Pelargonium zonale*, *Datura stramonium* und *Solanum lycopersicum* Blüten- und Fruchtbildung hemmend auf die Entwicklung von Tumoren. Da sich bekanntlich vegetatives Wachstum und Fruktifikation antagonistisch verhalten und nach eigenen Versuchen zwischen Tumorengröße und Wachstumsintensität der Wirtspflanze bzw. einzelner Triebe direkte Beziehungen bestehen, ist diese Beobachtung durchaus verständlich.

An 21 Begonienpflanzen (Begonia semperflorens) wurden regelmäßig die Blüten entfernt, während 21 andere Blüten und Samen behielten. Aus jeder Gruppe wurden je 3 Pflanzen mit einem der 7 Bakterienstämme geimpft. Die Begonien ohne Blüten erhielten im ganzen 87, die mit Blüten 96 Impfstiche. 95 Tage nach der Infektion konnten in der Gruppe ohne Blüten 18 Wucherungen = 21%, in der mit Blüten 17 Wucherungen = 18% festgestellt werden. Die größeren Tumoren befanden sich an den blütenlosen Pflanzen. Diese zeigten bedeutend kräftigeren Wuchs als die anderen. Bei Vergleichsimpfungen an Tomaten riefen die gleichen Bakterienkulturen an allen Impfstellen Wucherungen hervor.

An geimpften mehrtriebigen Pelargonien, bei denen Blütenbildung und Wachstum nicht künstlich beeinflußt werden, entwickeln sich die Tumoren an den einzelnen Trieben oft verschieden stark, auch wenn diese gleichwüchsig erscheinen. Da bei Pelargonium die Seitentriebe nicht gegenständig sind, besteht die Möglichkeit, daß der Saftstrom zu 2 Trieben ungleichmäßig stark ist und dadurch eine verschieden gute Ernährung derselben und damit der daran sitzenden Tumoren stattfindet.

Schneidet man dagegen an jungen Tomatenpflänzchen den Trieb dicht oberhalb der Keimblätter ab, so entwickeln sich in den meisten Fällen aus den Achseln der Keimblätter zwei gegenständige, meistens gleichstarke Triebe. Wenn auch manchmal in der Folgezeit der eine Trieb kräftiger wird als der andere, so bleiben doch häufig die beiden Triebe in bezug auf Wüchsigkeit gleichwertig, so daß die Wahrscheinlichkeit einer gleichmäßigen Ernährung in viel weitgehenderem Maße gegeben ist, als bei wechselständig inserierten Trieben. Zur Untersuchung des Einflusses der Blüten- und Fruchtbildung bzw. der Wachstumsintensität auf die Entwicklung von Tumoren wurden an 30 derartig zweitriebigen Tomaten (23 Dänischer Export und 7 Erste Ernte) jeweils an einem Trieb die Blüten und Früchte belassen, während an dem anderen die jungen Knospenansätze regelmäßig entfernt wurden. Die Impfung erfolgte an 3 verschiedenen Gruppen je 10 zweitriebiger Tomaten (Tab. 7).

Tab. 7. Beziehungen zwischen Wucherungsgröße und Triebstärke bzw. Blüten- und Fruchtbildung bei Tomaten. Versuchsdauer 54 Tage.

Triebe	Anzahl der Pflanzen mit		
	größeren Wucherungen an Trieben		gleichgroßen Wucherungen an beiden Trieben
	mit Blüten u. Früchten	ohne Blüten u. Früchte	
mit Bluten und Früchten stärker als die ohne Blüten und Früchte	4	—	6
ohne Blüten und Früchte stärker als die mit Blüten und Früchten	—	6	4
gleich stark	1	—	9

Nach diesen Versuchen bilden, wenigstens bei Tomaten, die kräftigeren Triebe auch die größeren Tumoren aus.

An Freilandreben 14 verschiedener Sorten wurden Zielhölzer am 14. bzw. 15. 9. 1932 je 10 mal mit einer Nadel geimpft. Die Auswahl der Zielhölzer war so erfolgt, daß bei jeder Rebsorte eines Trauben trug, eines nicht, um festzustellen, ob die bereits vorhandenen Früchte einen Einfluß auf die

Tumorentwicklung haben würden. Bis zum Laubfall 1932 trat keine Gewebeneubildung mehr ein. Im Frühjahr 1933 wurden die behandelten Zielhölzer zu Bogreben gebunden. Eine Entfernung der Blüten bzw. Früchte erfolgte nicht. Am 27. Okt. 1933 konnten bei folgenden Rebsorten die angegebene Anzahl Wucherungen an den vorjährigen Zielhölzern mit Trauben bzw. an denen ohne Trauben gefunden werden: W. Elbling 0 bzw. 1, W. Gutedel 3 bzw. 3, St. Laurent 2 bzw. 0, Riesling 0 bzw. 1, Riesling × Silvaner 1 bzw. 3, Ruländer 1 bzw. 0, Silvaner 1 bzw. 2, Trollinger 0 bzw. 1. Beachtliche Größenunterschiede waren nicht festzustellen. Bei den Rebsorten Frühburgunder, Spätburgunder, W. Burgunder, R. Elbling, Färbertraube und Müllerrebe hatten sich keine Tumoren gebildet. Zählt man die Wucherungen von allen Rebsorten nach traubentragenden und nicht traubentragenden Zielhölzern zusammen, so sind in der Gruppe mit Trauben 8 = 10% Tumoren vorhanden, in der ohne Trauben 11 = 14%. Zwischen Impfung und Lese lagen etwa 25 Tage, also nahezu die bei Reben festgestellte kürzeste Inkubationszeit. Eine Benachteiligung der Wucherungsbildung durch das Vorhandensein von Früchten war also auch bei Reben zu erkennen.

Wenn auch die Befallsprozente bei den Pflanzen bzw. Trieben ohne Blüten und Früchte in den 3 Versuchen nur wenig höher sind, so findet diese Abweichung doch in allen Fällen zugunsten der nur vegetativ wachsenden Pflanzen oder Triebe statt.

Hörter (43) gibt an, daß Reben am häufigsten im Alter von 3—4 Jahren von der Mauke befallen werden. Nach Beobachtungen in der Rebpflanzung beim Dienstgebäude trifft dieses zu. Im allgemeinen findet im 3. und 4. Jahre auch der erste Fruchtansatz statt, der aber noch verhältnismäßig gering ist. In den folgenden Jahren steigt der Fruchtansatz, während die Zahl der Maukeerkrankungen abnimmt. Auch diese Beobachtungen bestätigen die unmittelbaren Beziehungen zwischen vegetativem Wachstum und Tumorenwachstum. Es ist allerdings auch zu berücksichtigen, daß an den Reben in den ersten Jahren ein viel „brutalerer" Rückschnitt erfolgt als später und daß an Stöcken mit Trauben ein großer Teil der Assimilate in diese abgeleitet wird und bei der Lese für den Stock verlorengeht, während an Stöcken ohne Früchte die Assimilate in den Holzkörper und damit auch in die Tumoren geleitet werden können.

4. Vorhandener Befall.

Für die Vermehrung der Reben durch Setzholz ist es von Wichtigkeit, ob maukekranke Reben dem Krankheitserreger gegenüber anfälliger sind als gesunde. Wenn dies der Fall wäre, dürfte das Zielholz kranker Stöcke nicht zur Vermehrung verwendet werden (62, 65). Um die Frage zu klären, wurden am 15. Juli 1931 Parallelimpfungen an Topfreben vorgenommen, die 1. von gesunden, 2. von maukekranken wurzelechten, 3. von maukekranken gepfropften Elblingstöcken, 4. von gesunden, 5. von maukekranken Rieslingstöcken stammten. Die 3. Gruppe wurde eingefügt, weil bei Pfropfreben, die Maukewucherungen an der Pfropfstelle tragen, oft schwer zu entscheiden ist, ob die Wucherung vom Edelreis oder von der Unterlage ausgeht. Jede Gruppe umfaßte 40 Topfreben und jede Rebe wurde 10 mal durch Nadelstiche mit Stamm I geimpft und zwar je 20 Reben in die Internodien und je 20 in die Knoten. Im Laufe des Winters 1931/32 gingen einige

Reben zugrunde, während an anderen die oberen Internodien und damit die oberen Impfstellen abstarben.

Bei der Nachschau am 29. Juli 1932 zeigten die 5 Gruppen in der oben angegebenen Reihenfolge einen Gesamtbefall von 25, 20, 12, 17 bzw. 14%. Die geringeren Befallsprozente in der 2. und 3. Gruppe werden z. T. durch die weniger starke Wirkung der Impfungen in die Knoten bedingt. Auch nach anderen Versuchen erscheint die Impfung der Internodien vorteilhafter als die der Knoten.

Da die Infektionsbedingungen nach allen bisher durchgeführten Versuchen im Gewächshaus günstiger liegen als im Freiland, hätte eine höhere Anfälligkeit der von maukekranken Stöcken stammenden Reben im Gewächshaus um so deutlicher in Erscheinung treten müssen.

Ob im Freiland stehende, spontan an Mauke erkrankte Rebstöcke bei neuen Infektionen anfälliger sind als gesunde, sollte im folgenden Versuch geprüft werden.

Am 18. Okt. 1932 wurden mit den Stämmen VI und VII je 10 Impfungen in die Schenkel von je 15 Rebstöcken vorgenommen, die bereits Wucherungen trugen bzw. frei davon waren. Bei der Nachschau am 12. Juli 1933 zeigten sich so unregelmäßige und widersprechende Ergebnisse, daß die Frage nach der größeren Anfälligkeit gesunder oder maukekranker Reben auf Grund dieses Versuches weder in dem einen, noch in dem anderen Sinne entschieden werden konnte.

Wurden Tomaten im oberen Teil des Sprosses geimpft, während im unteren Teil bereits Wucherungen vorhanden waren, so zeigte sich in bezug auf die Entwicklung der neuen Tumoren kein Unterschied gegenüber denen an nur einmal beimpften Vergleichspflanzen. Ebenso ließ sich keine Beeinflussung der Tumorenentwicklung feststellen, wenn die neuen Impfstellen nahe an die alten Wucherungen herangerückt wurden oder bei angestochenen Tomaten die neuen Impfstellen den alten am Stamm gegenüber lagen. Eine Beeinflussung neuer Infektionen durch bereits vorhandene Wucherungen ließ sich also nicht nachweisen.

Brown (13) beobachtete eine zeitweilige Resistenzsteigerung bei Stecklingsvermehrung von crowngall-kranken Paris Daysi-Pflanzen (*Chrysanthemum frutescens*) und nachfolgender Impfung. Bei weiterer gleichartiger Behandlung ging die Resistenzerhöhung jedoch wieder verloren.

VII. Bekämpfung.

1. Natürliche Ausheilung.

Die in dem 1927 gepflanzten Sortiment wirtschaftlich wichtiger Rebsorten beim Dienstgebäude stehenden traubentragenden Rebstöcke wurden in den Jahren 1930 bis 1933 nach Abschluß der Vegetationszeit auf Maukewucherungen untersucht. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengestellt.

Weitere Beobachtungen über den Verlauf von Maukeerkrankungen an Rebstöcken wurden in einem Weinberg der Preuß. Rebenveredlungsanstalt in den Jahren 1929—1933 durchgeführt. Die Ergebnisse sind aus Tab. 9 ersichtlich.

Eine Eintragung der in den einzelnen Jahren kranken Stöcke in einen Plan der Parzelle (Abb. 9) zeigt eine auffällige Häufung dieser Stöcke in der Mitte der linken Hälfte, während die rechte untere Hälfte nahezu voll-

Tab. 8. Maukeerkrankungen im Sortiment wirtschaftlich wichtiger Rebsorten in den Jahren 1930 bis 1933.

Rebsorte	Zahl der beobachteten Stocke				Zahl der maukekranken Stocke				Bemerkungen
	1930	1931	1932	1933	1930	1931	1932	1933	
Fruhburgunder	8	8	5	7	0	0	0	0	
Spatburgunder	10	10	10	15	0	0	0	0	
W. Burgunder	6	6	6	7	0	0	0	0	
R. Elbling	4	4	5	9	1	1	1	1	1930—1933 ders. Stock
W. Elbling	13	13	12	14	2	0	0	1	1930 u. 1933 versch. St.
Farbertraube	15	15	13	16	8	2	3	0	3 St. 1930 krank 2 „ 1930 u. 1931 kr. 3 „ 1930 „ 1932 „
W. Gutedel	12	12	14	15	2	0	0	0	
St. Laurent	14	14	14	16	2	2	3	1	2 St. 1930—1932 krank 1 „ 1932 krank 1 „ 1933 „
Mullerrebe	14	13	14	17	1	0	1	0	verschiedene St. krank
Portugieser	6	6	12	17	2	1	3	1	1 St. 1930—1933 krank 1 „ 1931 u. 1932 kr. 1 „ 1933 krank
Riesling	14	14	14	18	0	0	0	0	
Riesling × Silvaner	13	13	13	17	1	2	2	0	1 St. 1930—1932 krank 1 „ 1931 u. 1932 „
Ruländer	11	11	11	16	0	0	0	0	
Silvaner	6	6	8	12	1	0	0	0	
Trollinger	12	12	14	18	7	9	9	2	1 St. 1930 krank 1 „ 1930 u. 1931 kr. 4 „ 1930—1932 krank 1 „ 1930—1933 „ 1 „ 1931—1933 „ 2 „ 1931 u. 1932 „ 1 „ 1932 krank
Gesamtzahl:	158	157	165	214	27	17	22	6	
Krank insges. %:					17,1	10,8	13,3	2,8	

Tab. 9. Maukeerkrankungen an Elblingstocken der Weinbergslage Berncasteler Haargarten in den Jahren 1929 bis 1933.

Maukekrank	1929	1930	1931	1932	1933
von 1929 bis	20	9	7	7	6
„ 1930 „	—	16	5	5	3
„ 1931 „	—	—	15	2	0
„ 1932 „	—	—	—	8	4
„ 1933 „	—	—	—	—	5
1929 und	—	—	1	1	0
1929, 1930 und	—	—	—	1	1
1929, 1930, 1932 und	—	—	—	—	1
1930 und	—	—	—	5	2
1930, 1932 und	—	—	—	—	2
1931 und	—	—	—	—	1
Insgesamt:	20	25	28	29	25
Prozent:	3,8	4,8	5,4	5,6	4,8

ständig aus gesunden Stöcken besteht. Die übrigen Teile der Parzelle sind fast gleichmäßig mit kranken Stöcken besetzt. Von den im Jahre 1931 kranken Stöcken der rechten oberen Hälfte trugen einzelne die Wuche-

rungen verhältnismäßig hoch am Schenkel, so daß die kranken Stellen beim Schnitt beseitigt wurden, sonst fand keine Bekämpfung der Mauke in der Versuchsparzelle statt. Nach in der Zweigstelle durchgeführten Bodenuntersuchungen (207) liegen innerhalb der Parzelle Haargarten keine wesentlich von der Norm abweichenden chemischen Verhältnisse vor. Die Ursache der Häufung der Maukewucherungen in der linken Parzellenhälfte kann in der verschiedenen Wasserführung liegen. An der rechten oberen Ecke der Parzelle liegt ein Sammelschacht der von oben kommenden Drainageleitung mit Ableitung entlang der rechten Seite der Parzelle. Hierdurch wird wahrscheinlich stauende Nässe von der rechten unteren Hälfte ferngehalten.

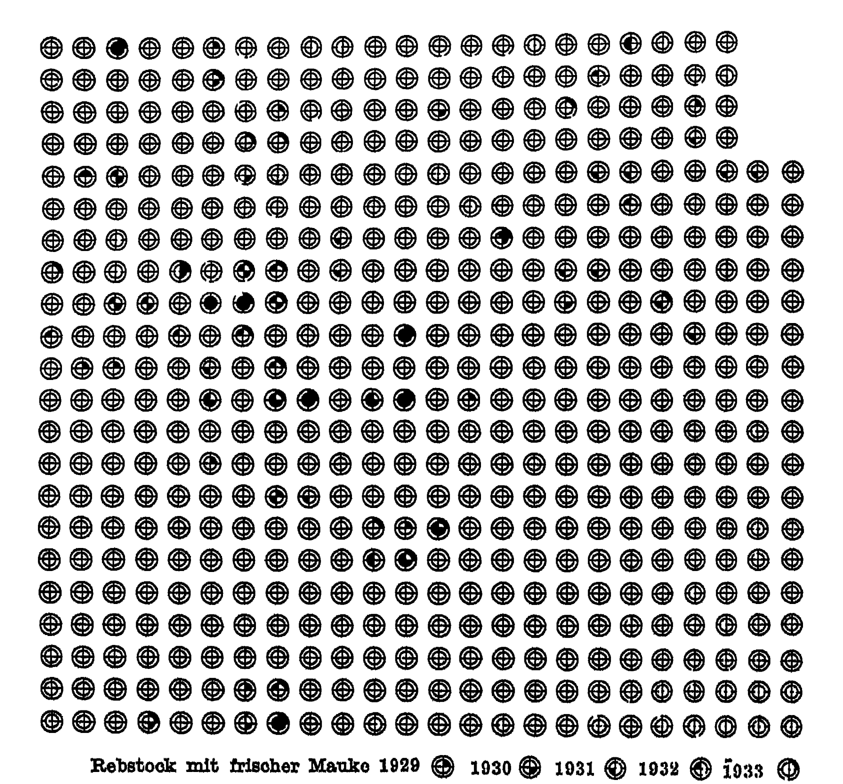


Abb. 9. Plan einer Elbling-Pflanzung in der Weinbergslage Berncasteler Haargarten.

Die Mauke kann nach diesen Beobachtungen als einjährige Krankheit auftreten, d. h. die im Laufe eines Sommers gebildeten Wucherungen sterben im Herbst ab, ohne daß im nächsten Jahre an derselben Stelle neue Wucherungen entstehen. Auch nach 2 jähriger Erkrankung kann im folgenden Jahre eine Gewebeneubildung unterbleiben. Ein Fall wurde beobachtet, in dem ein Stock im 1. Jahr erkrankte, im 2. ohne neue Wucherungen blieb, im 3. wieder frisches Maukegewebe bildete und im 4. und 5. keine Neubildungen zeigte.

Bei längerer Dauer der Krankheit wird ein Ausheilen seltener eintreten, weil in diesen Fällen meistens schon größere Flächen der Rinde zerstört sind und eine Überwallung durch normales Wundgewebe nur langsam statt-

finden kann. Umschließt die Wucherung den ganzen Schenkel, so ist mit einer Ausheilung nicht mehr zu rechnen. Der Stock muß dann entweder unterhalb der Wucherung abgeschnitten oder durch einen neuen ersetzt werden. Daß eine vollständige Ausheilung der Mauke an Reben erfolgen kann, ist nach den bisherigen Beobachtungen sehr wahrscheinlich. Haben doch z. B. im Sortiment der Zweigstelle die Maukewucherungen der Zahl nach in den 4 Beobachtungsjahren erheblich abgenommen! Auch im Haargarten befinden sich einige Stöcke, die 4 Jahre nach einer Maukeerkrankung keine neuen Wucherungen gebildet haben. Wenn eine Ausheilung unmöglich wäre, müßte in manchen Weinbergen ein erheblich stärkerer Verlust an Stöcken durch Mauke stattfinden. In einem Weinberg an der Saar waren z. B. im Jahre 1929 nahezu 100% der Stöcke maukekrank, während im Jahre 1932 nur nach längerem Suchen einige erbsengroße Wucherungen an einzelnen Stöcken gefunden werden konnten. In der Zwischenzeit war nur eine verhältnismäßig kleine Anzahl von Stöcken neu gepflanzt worden. Ist in einem Weinberg Jahr für Jahr ein erheblicher Prozentsatz der Stöcke maukekrank, so kann man auf ungünstige Bodenverhältnisse oder falsche Pflegemaßnahmen schließen.

Ähnliche Ergebnisse wie an den Reben lieferten Beobachtungen an Pelargonien, die 1928 mit Pseud. tumefaciens beimpft worden waren.

Eine Pelargonienpflanze (Nr. 500) wurde am 4. Febr. 1928 dreimal durch Nadelstiche mit Stamm II am Sproß beimpft, und zwar zweimal angestochen und einmal durchstochen. Am 24. April 1928 zeigten der unterste und oberste Stich je eine Wucherung von 7 mm Durchmesser, der mittlere nur einen kleinen trockenen Fleck. Am 13. Nov. 1928 hatte die untere Wucherung einen Durchmesser von 25,5 mm, die obere von 16 mm erreicht. Beide Tumoren waren bereits abgestorben. Im Frühjahr 1929, also ein Jahr nach der Impfung, bildete sich an dem mittleren Stich eine Wucherung, die im Laufe des Sommers etwa 1 cm Durchmesser erreichte. Die beiden vorjährigen Tumoren wuchsen nicht nach. Im Sommer 1930 waren sämtliche Tumoren abgestorben. Im Jahre 1931 konnte an der mittleren, im Jahre 1932 an der unteren und mittleren Wucherung neues Gewebe festgestellt werden. Am 26. Jan. 1933 setzte an der unteren Impfstelle an einer Seite neues Wachstum ein, während die anderen Tumoren tot blieben.

Das Pelargonium Nr. 556 wurde am 4. Febr. 1928 durch Nadelstiche mit Stamm I beimpft, und zwar zweimal durchstochen und dreimal angestochen. Im ersten Sommer entstanden drei Wucherungen, die ebenfalls zeitweise neues Gewebe bildeten, aber die Pflanzen in sechs Jahren nicht zum Absterben brachten. Ein drittes krebskrankes Pelargonium wurde vier Jahre hindurch bei guter Entwicklung gehalten.

Die bis 6 jährigen Beobachtungen haben gezeigt, daß Pelargonien auch mit durch Pseud. tumefaciens hervorgerufenen Tumoren noch Jahre hindurch leben können. „Maukekranke“ Tomaten konnten leicht 1½—2 Jahre bei gutem Wachstum erhalten werden.

Ging eine Tomate, die mit Wucherungen besetzt war, infolge der Jahreszeit, mangelhafter Ernährung oder Befall durch Cladosporium fulvum langsam ein, so konnte man im allgemeinen beobachten, daß die Wucherungen noch an Größe zunahmen, während die Blattfläche sich immer weiter verringerte. Die Geschwülste starben auch gewöhnlich langsamer ab als die Triebe. Voraussetzung war allerdings, daß sich auf den Wucherungen keine Pilze angesiedelt hatten. War dieses der Fall, so griff das Absterben von der Wucherung auf den Sproß über und die Leitungsbahnen zwischen Wurzeln und Gipfel wurden zerstört.

2. Schutz gegen Infektion.

Das Eindringen des Maukeerregers in den gefährdeten Pflanzenteil und damit die Entstehung der Mauke kann verhindert werden, wenn es ge-

lingt, die Pflanze mit einem für sie unschädlichen und für die Bakterien undurchdringlichen dauerhaften Schutzmittel zu überziehen.

Stapp (180) hat vorgeschlagen, junge, noch gesunde Pfropfreben in maukegefährdeten Weinbergen mit 50 proz. wässeriger Dendrin- oder 0,5 proz. wässeriger Uspulunlösung zu desinfizieren und durch eine Einbeutelung der Propfstelle in Ölpapier gegen Infektion zu schützen. Die Umhüllungen sollen je nach der Lage der Weinberge und den Witterungsverhältnissen Ende April bis Anfang Mai oder erst im Mai oder Juni angelegt und etwa Mitte bis Ende August wieder entfernt werden.

Ein derartiges Verfahren würde die Rebe zur Zeit der Frühjahrsfröste wohl vor Infektion schützen können, die übrige Zeit, zu der auch Infektionsmöglichkeit besteht, jedoch nicht. Vielleicht können auch unter der Umhüllung an der Pfropfstelle bei entsprechender Witterung ungünstige Feuchtigkeits- oder Temperaturverhältnisse entstehen und die Rebe in ihrer normalen Entwicklung stören. Über die Wirkung von 50 proz. Dendrin folgen Angaben weiter unten.

Ein Schutz gegen Infektion könnte durch eine Substanz gebildet werden, die sich mit einem Pinsel auftragen und beim Dickenwachstum der Reben dehnen ließe. Infolge des Absterbens und Absplitterns der äußeren Rinde wäre jedoch auch diese Methode nicht für das ganze Jahr wirksam. Bei allen derartigen Verhütungsmaßregeln muß berücksichtigt werden, daß die Inkubationszeit bei Reben nahezu 1 Jahr betragen kann, also selbst beim Pflanzen äußerlich nicht maukekranker Wurzelreben nicht mit Sicherheit festzustellen ist, ob dieselben tatsächlich gesund oder bereits infiziert sind.

Zur orientierenden Prüfung von Abdeckmitteln wurden folgende Versuche durchgeführt: Je 2 in Töpfe gepflanzte einjährige Amerikaner-Wurzelreben der Sorten Solonis × Riparia 1616 C. und Berlandieri × Riparia d T., bei denen 20—30 cm des Setzholzes über der Erde standen, wurden am 11. Juli 1929 mit Vaseline, Präparatenkitt[1]) bzw. 50 proz. Obstbaumkarbolineum (Avenarius Dendrin) bestrichen. Am 20. Juli wurden außerdem bepinselt mit 50 proz. Dendrin: 1 R. Traminer, 1 Solonis × Riparia 1616 C., 3 Berlandieri × Riparia a T., 3 Berlandieri × Riparia d T., 3 W. Calabreser; mit 100 proz. Dendrin: 3 Solonis × Riparia 1616 C., 2 Berlandieri × Riparia a T., 1 Berlandieri × Riparia b T. und 2 Pfropfreben Riesling auf Berlandieri × Riparia b T. Die Reben waren im Austrieb noch weit zurück. Die größte Länge der jungen Triebe betrug 7 cm.

Am 26. Aug. 1929 waren von den Reben folgende abgestorben:

bestrichen mit Vaseline	1 =	25%
„ „ Präparatenkitt	0 =	0%
„ „ 50proz. Dendrin	11 =	73%
„ „ 100proz. Dendrin	8 =	100%

Bis zum Frühjahr 1930 stieg die Menge der abgestorbenen Reben bei den 3 ersten Mitteln auf 50, 50 bzw. 87% an. Die genannten Präparate kommen also wegen der Benachteiligung der Reben als Abdeckmittel nicht in Frage.

Da jedoch Obstbaumkarbolineum (121) besonders aus der Praxis als brauchbares Bekämpfungsmittel genannt wird, wurden weitere Versuche

[1]) Zusammensetzung: 700 g venet. Terpentin, 210 g gelbes Wachs, 100 g weiße Vaseline. Der Kitt hat den Vorzug, daß er nicht ganz fest wird und beim Dickenwachstum der Triebe nachgeben kann.

mit demselben und gleichzeitig mit einigen anderen Substanzen angestellt. 5 Platinösen einer Kultur des Stammes I in 1 ccm des zu prüfenden Präparates verrührt, dienten als Impfmaterial bei je 4 Nadelstichen quer durch Rizinuspflanzen. Der Rest der Aufschwemmung wurde zum Beimpfen von Malzextraktagar-Platten benutzt. Als Kontrolle diente eine Aufschwemmung von 5 Platinösen derselben Bakterienkultur in destilliertem Wasser. Das Ergebnis ist aus Tab. 10 ersichtlich.

Tab. 10. Impfversuche mit Pseudomonas tumefaciens, Stamm I, behandelt mit verschiedenen Substanzen.

Mittel	Konzentration %	Platte	Anzahl der Wucherungen nach 137 Tagen
Dendrin . . .	0,1	negativ	0
	0,01	,,	1
	0,001	positiv	4
	0,0001	,,	4
	0,00001	,,	4
$BaCl_2$	1	,,	tot
	0,1	,,	,,
	0,01	,,	4
	0,001	,,	4
$MnSO_4$ . . .	1	,,	4
	0,1	,,	4
	0,01	,,	4
	0,001	,,	4
$Pb(NO_3)_2$ . .	1	negativ	—
	0,1	,,	—
	0,01	positiv	4
	0,001	,,	4
Li_2CO_3 . . .	1	,,	2
	0,1	,,	4
	0,01	,,	tot
	0,001	,,	,,
$KMnO_4$ . . .	1	negativ	0
	0,1	,,	0
	0,01	,,	0
	0,001	positiv	4
H_2O	—	,,	4

Nach dem Ergebnis der Platten wirkten $BaCl_2$, $MnSO_4$ und Li_2CO_3 unzureichend, $Pb(NO_3)_2$, $KMnO_4$ und Dendrin besser, in den gleichen Konzentrationsgruppen etwa übereinstimmend. Bei den Versuchspflanzen war das Ergebnis ähnlich. Das Impfmaterial der ersten Gruppe bewirkte nahezu regelmäßig die Ausbildung von Tumoren, während bei der zweiten Gruppe entsprechende Hemmungen festgestellt werden konnten. Am günstigsten schnitt $KMnO_4$ ab, das noch bei einer Konzentration von 0,01% die Entwicklung von Tumoren vollständig unterband.

Uspulun-Lehmbrei wird verschiedentlich als Schutzmittel für junge Obstbäume und Reben gegen Wurzelkropf bzw. Mauke empfohlen (36, 45, 122, 179). Uspulun wurde deshalb in folgenden Versuchen geprüft:

2 Platinösen des Maukeerregers in 1 ccm Uspulunlösung aufgeschwemmt und bei 5 Stichen durch eine Rizinuspflanze als Impfmaterial benutzt, ergab bei 0,1% 1, 0,05% 4, 0,01% 3, 0,005% 5, 0,001% 5, 0,0005% 5 Wucherungen. Auf Rebstielauszuggelatine-Platten war Wachstum festzustellen bis zu einer Uspulunkonzentration

des Impfmaterials von 0,005%. Die Prüfung der Wirksamkeit von Uspulun-Lehmbrei (verwendet wurde sandiger Lehm) fand in der Weise statt, daß in je 2 Tomaten- und Rizinuspflanzen mit einem sterilen Skalpell ein Längsschnitt von etwa 10 cm Länge gemacht und dieser mit Lehmbrei, der 1, 0,5, 0,25 0,1, bzw. 0,05% Uspulun enthielt, bestrichen wurde. Nach dem Antrocknen ließ man aus einer Pipette eine Aufschwemmung von Stamm I in Wasser darüberfließen. Als Kontrolle dienten Tomaten- und Rizinuspflanzen 1. angeschnitten und mit Lehmbrei ohne Uspulunzusatz bestrichen, 2. zur selben Zeit wie die abgedeckten angeschnitten, aber nicht bestrichen und 3. unmittelbar vor der Infektion angeschnitten. Bei der Nachschau nach 36 Tagen trugen sämtliche Pflanzen Wucherungen bis auf je eine Tomate und einen Rizinus, die mit 1proz. Uspulun-Lehmbrei behandelt worden waren. Es saßen in allen Fällen die Wucherungen sowohl am oberen wie am unteren Ende des Schnittes. Wenn nur der obere Teil infiziert gewesen wäre, hätte man dies darauf zurückführen können, daß beim Überfließen von 2—3 ccm der Bakterien-Aufschwemmung der Lehmbrei und damit das Uspulun an dieser Stelle ab- bzw. ausgewaschen worden wäre. Wenn dieses Auswaschen aber in der ganzen Länge des Schnittes stattfand, so war der Uspulun-Lehmbrei als Desinfektionsmittel unbrauchbar. Im Freiland würde durch den ersten Regen ein Abwaschen und damit eine Beseitigung der Schutzschicht erfolgen.

Nach den bisher gemachten Erfahrungen ist es also praktisch nicht möglich, die Reben durch Einhüllen oder Bepinseln gegen Maukebefall völlig zu schützen.

3. Bekämpfung vorhandener Mauke.

Da die Mauke eine rein lokale Erkrankung ist, muß die Heilung der von ihr befallenen Pflanze möglich sein, wenn es gelingt, den Krankheitsherd so zu entfernen, daß eine normale Wundheilung eintreten kann. Durch die restlose Beseitigung des kranken Gewebes wird bei umfangreichen Wucherungen eine entsprechend große und tiefe Wunde entstehen, die unter Umständen den Nährstoffstrom mehr stört als der Stock ertragen kann. Natürlich muß während oder nach der Operation eine Neuinfektion vermieden werden. Bei kleineren Maukewucherungen hat sich das Ausschneiden der Geschwülste als brauchbar erwiesen.

An einer Rizinuspflanze wurden 9 Wucherungen von mindestens 4,5 × 4,5 mm und höchstens 10,5 × 13,8 mm Größe, die an flachen Nadelstichen entstanden waren, mit einem Skalpell bis auf das gesunde Gewebe ausgeschnitten und darauf die Wundflächen mit einem heißen Skalpell eingebrannt. Im Laufe von 4 Monaten entstanden an den behandelten Wundflächen keine neuen Wucherungen. Die Brandwunden bilden für den Maukeerreger keine Eingangspforten; denn 20 mit einer quergehaltenen erhitzten Nadel an 2 Rizinuspflanzen hergestellte Brandstellen lieferten trotz Impfung durch Auftropfen einer Bakterien-Aufschwemmung keine Wucherungen.

Die Beseitigung von Tumoren an Rizinus gelang dagegen nicht bei einer mit infizierter Nadel zehnmal quer durchstochenen Pflanze. An den 5 oberen Einstichen wurden die etwa 1 cm großen Wucherungen mit einem Skalpell abgeschnitten, an 4 Ausstichen ebenfalls. Die Wunden wurden gleich darauf mit Baumwachs abgedeckt. Nach 5 Wochen hatten sich 3 neue Wucherungen gebildet. Am Stichkanal reichte das kranke Gewebe bis in den Hohlraum des Internodiums hinein. Hier blieben daher beim Abschneiden der Wucherungen Reste derselben zurück, die später neu auswuchsen.

Ein durch flache Nadelstiche in die Rinde mit Stamm I beimpftes Pelargonium trug sechs 2—5 mm große Wucherungen. Von diesen blieben 2 unbehandelt, 2 wurden mit einem $AgNO_3$-Stift (Höllensteinätzstift mit 1% Kaliumnitrat der Fa. E. Merck, Darmstadt) bestrichen und 2 dicht am Trieb abgeschnitten und die Wundflächen bestrichen. An einem anderen zur Infektion zehnmal mit einer Nadel halb durchstochenen Pelargonium hatten sich neun 4—10 mm große Wucherungen entwickelt, 3 davon blieben unbehandelt, 6 wurden abgeschnitten und 4 von den dadurch entstandenen Wundflächen mit $AgNO_3$ bestrichen.

Kurze Zeit nach der Behandlung färbten sich die mit $AgNO_3$ bestrichenen Wucherungen grauschwarz und trockneten ein. Die Wundflächen verhielten sich ebenso. Die unbehandelten Wucherungen wuchsen weiter. An den 2 nicht mehr behandelten Wundflächen entstanden neue Wucherungen, während an den 4 mit $AgNO_3$ be-

strichenen in einem Fall neues Wachstum eintrat. Es war hier die Wucherung nur oberflächlich abgeschnitten worden. Die $AgNO_3$-Behandlung hatte daher nicht die nötige Tiefenwirkung gehabt, ein Nachwachsen der Wucherung von innen her zu verhindern.

An 2 zehnmal durchstochenen Pelargonien mit Wucherungen von 3—10 mm Durchmesser wurden jeweils die unteren 5 mit einem Skalpell abgeschnitten. Es entstand dadurch an der einen Pflanze eine Wunde von etwa 47 mm Länge, an der anderen 5 Einzelwunden bis zu 10 mm Durchmesser. Die Wunden reichten nahezu bis auf die Sproßachsen. Um ein Eintrocknen zu vermeiden, wurden die Schnittflächen mit Paraffin vom Schmelzpunkt 46—48° abgedeckt. Im Laufe eines Jahres bildeten sich an den Wundflächen keine neuen Wucherungen, während die unbehandelt gebliebenen Tumoren weiter an Größe zunahmen.

An Wurzelreben findet man manchmal am Fußende oder an den Blendstellen Maukewucherungen bis zu der Größe eines Hühnereies. Im allgemeinen werden diese Wurzelreben zum Pflanzen nicht benutzt. Wenn es sich um hochwertiges Setzholz oder um Pfropfreben, bei denen die Erscheinungen dieselben sind, handelt, so kann der Ausfall einen nicht unbeträchtlichen Verlust bedeuten. Es wurden deshalb in den Jahren 1930 bis 1933 einschließlich maukekranke gepfropfte und ungepfropfte von der Preuß. Rebenveredlungsanstalt Berncastel zur Verfügung gestellte Wurzelreben in verschiedener Weise behandelt und zur weiteren Beobachtung im Versuchsgelände eingepflanzt. Jeweils nach einem Jahr wurden die Reben unter möglichster Schonung der Wurzeln zur Nachschau ausgegraben und danach, soweit das zur Verfügung stehende Gelände ausreichte, wieder in den Boden gesetzt. Die Ergebnisse der Versuche sind in Tab. 11 zusammengestellt. Vor der Berechnung der Prozentsätze der gesunden Reben in den einzelnen Gruppen sind die vereinzelten toten abgesetzt, weil nahezu keine von ihnen infolge der Behandlung eingegangen war. Nach den Versuchsergebnissen werden Wurzelreben durch Tumoren an den Fußenden oder Blendstellen nicht unbrauchbar. Zweckmäßig ist es, die Wucherungen vor dem Pflanzen der Reben zu entfernen und die Wundflächen mit einem Desinfiziens, z. B. 0,1 proz. Sublimatlösung zu bepinseln.

Sollte sich eine Rebschule als sehr stark mit Pseud. tumefaciens verseucht erweisen oder es allmählich werden und kein Wechsel des Geländes möglich sein, so müßte eine Entseuchung des Bodens versucht werden (191). Nach Shorbakoff (160) hatte in einer Baumschule eine Behandlung des Bodens mit Schwefel (600 pounds per acre = etwa 700 kg/ha) eine sehr gute Wirkung.

Weitere Bekämpfungsversuche kamen an oberirdischen Wucherungen zur Durchführung.

Im Versuchsgelände beim Dienstgebäude wurden am 18. März 1931 an 7 Pfropfreben Elbling auf Riparia × Rupestris 13 G. die am Edelreis sitzenden Maukewucherungen bis auf das gesunde Holz ausgeschnitten und die Schnittflächen mit 1 proz. Lysol bepinselt. Im nächsten Sommer bildeten sich bei 2 Reben an den behandelten Wundflächen, an 2 weiteren an anderen Stellen neue Wucherungen, während 3 vollständig frei blieben. Die Wucherungen waren in allen Fällen verhältnismäßig klein. Im Jahre 1933 waren 6 Reben maukekrank und nur 1 gesund. 6 Pfropfreben derselben Pflanzung wurden nur oberflächlich von den Maukewucherungen befreit und ebenfalls mit 1 proz. Lysol bestrichen. In dieser Gruppe waren im 1. Jahr nach der Behandlung 2 Reben frei von Wucherungen, eine dritte zeigte einen neuen kleinen Tumor an einer nicht behandelten Stelle, während bei 3 Reben an den behandelten Wundflächen mehr oder weniger starke

Tab. 11. Maukebekämpfungsversuche an Wurzelreben.

Anzahl	Rebsorte	Behandlungsjahr	Behandlungsart	% der Reben ohne neue Wucherungen nach Jahren 1	2	3	4
27	Wurzelreben verschiedener Sorten, gepfropft und wurzelecht	1930	unbehandelt	41	81	92	96
11	Riesling auf Mourvèdre × Rupestris 1202 C.	1931	,,	82	82	91	—
9	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1931	,,	22	67	67	—
25	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1932	,,	33	86	—	—
23	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1932	,,	22	83	—	—
10	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1933	,,	63	—	—	—
Sa.: 105				41	81	87	96
40	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1932	Wucherungen ausgeschnitten	95	98	—	—
10	Aramon × Riparia 143B M. G.	1930	Wucherungen ausgeschnitten u. Wundflächen bepinselt mit: Lysol 1%	100	100	—	—
17	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1931		71	77	98	—
5	Mourvèdre × Rupestris 1202 C.	1931		100	100	100	—
40	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1932		97	97	—	—
9	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1933		80	—	—	—
Sa.: 81				91	93		
9	W. Elbling auf Riparia × Rupestris 101[14] M. G.	1930	Lysol 1% + Präpar.-Kitt	89	100	—	—
20	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1932	Sublimat 0,1%	100	100	—	—
7	Aramon × Riparia 143B M. G.	1930	Sublimat 1%	100	100	—	—
20	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1932	,,	100	100	—	—
Sa.: 27				100	100		
10	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1930	$KMnO_4$ 0,5%	70	70	70	90
10	Pfropfreben verschiedener Sorten	1930	$KMnO_4$ 1%	70	70	70	90
10	Pfropfreben verschiedener Sorten	1930	$KMnO_4$ 1% + Präpar.-Kitt	50	78	78	89
10	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1932	Formalin 30%	100	—	—	—
10	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1930	Dendrin 50%	50	100	—	—
10	Riesling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1930	,,	100	100	—	—
10	W. Elbling auf Aramon × Riparia 143B M. G.	1931	,,	100	100	—	—
Sa.: 30				81	100		
10	Pfropfreben, Sorte unbekannt	1933	Lehmbrei mit Uspulun 1%	100	—	—	—

Gewebeneubildungen festgestellt werden konnten. Im zweiten Jahre waren von den 6 Reben 2 gesund, 4 krank. 3 Pfropfreben derselben Pflanzung blieben zur Beobachtung unbehandelt. Von diesen war eine in beiden Beobachtungsjahren krank, während die anderen beiden keine neuen Wucherungen bildeten. Bei 12 Pfropfreben Riesling auf Riparia × Rupestris 13 G. wurden ebenfalls am 18. März 1931 die Wucherungen ausgeschnitten und die Wunden mit 1 proz. Lysol bepinselt. In der nächsten Vegetationsperiode waren 4 Reben vollständig frei von Maukewucherungen, 2 an den Wundflächen gesund, aber an anderen Stellen neu erkrankt und 6 an den behandelten Flächen wieder krank. Im zweiten Jahre waren 6 Reben gesund und 6 krank. 3 maukekranke Pfropfreben Riesling auf Berlandieri × Riparia Tel. Kober 5 BB und 2 Riesling auf Berlandieri × Riparia Tel. 8 B blieben unbehandelt und bildeten in den nächsten Jahren keine neuen Wucherungen.

Der Vergleich der Rebgruppen untereinander wird dadurch beeinträchtigt, daß die genannten Rebsorten ungleich starkwüchsig sind und auf verschiedenen Unterlagen stehen. Der wirkliche Erfolg der Wundbehandlung war jedenfalls mit 44% Ausheilung im ersten Jahr verhältnismäßig ungünstig. Dabei handelt es sich um eine Behandlungsmethode, die bei Wurzelreben sehr gut gewirkt hatte. Nach Hörter (43) und eigenen Beobachtungen sind die Reben, wie bereits oben angegeben, etwa im dritten und vierten Jahr am stärksten von der Mauke gefährdet. Die behandelten Reben standen zur Zeit der Behandlung im vierten Laub. Da es sich um einen bisher für Weinbau nicht benutzten, tiefgründigen Boden handelt, wuchsen die Reben außerordentlich kräftig.

Auf Veranlassung der Zweigstelle kam am 16. und 17. März 1927 auf der Staatsdomäne Avelsbach bei Trier ein Mauke-Bekämpfungsversuch an wurzelechten Rieslingreben zur Durchführung. Die Wucherungen wurden mit Rebscheren und Messern bis auf das gesunde Holz ausgeschnitten und folgende Abdeckmittel mit steifborstigen Pinseln auf die Wundflächen aufgetragen: Steinkohlenteer, Formalin 30%, Baumwachs, Avenarius Dendrin 20%, Formalin 20%, Ferrosulfat 20%, Kalkmilch, Avenarius Dendrin 10%, Kupferkalkbrühe 2%, Uspulun-Lehmbrei 1%, Mittel von Lieske, Formalin 10%. Die Größe der Parzellen schwankte zwischen 350 und 450 Stöcken. Im Januar 1928 wurden in jedem Block je 100 behandelte Stöcke auf Wucherungen aus der Vegetationsperiode 1927 untersucht.

Gegenüber der unbehandelt gebliebenen Parzelle waren in den am besten ausgefallenen Versuchsparzellen (Formalin 30 proz. und Steinkohlenteer) nur 13% weniger Stöcke mit frischen Wucherungen zu finden. Die Wirkung war also so gering, daß sich in diesen Parzellen die vorgenommene Arbeit der Behandlung kaum gelohnt hatte. In anderen, z. B. der mit Eisenvitriol (111—113, 194) behandelten, war das Ergebnis noch ungünstiger. Auf eine Wiedergabe der Einzelergebnisse wird daher verzichtet. Im Jahre 1927 waren frische Maukewucherungen selten zu finden und im allgemeinen kleiner als im Jahre 1926.

Bei der Herrichtung der Rebstöcke für den vorstehenden Versuch war auch der in Frankreich zur Traubenwicklerbekämpfung benutzte, aus scharfkantigen Eisenringen bestehende Sabbaté-Handschuh verwendet worden. Er hat sich zum Abreiben alter Maukewucherungen von den Stöcken nicht bewährt. In dem schweren Handschuh ermüdet die Hand des Arbeiters sehr schnell, eine saubere Ent-

fernung der alten Wucherungen ist nicht moglich und außerdem werden noch gesunde Teile des alten Holzes leicht verletzt und infiziert.

Bei einem weiteren, am 18. März 1927 auf der Preuß. Domäne Avelsbach durchgeführten Versuch wurden die Stöcke je einer Rebzeile nach Entfernung der Maukewucherungen mit einem der jeweils zu prüfenden Mittel bepinselt.

6 Zeilen mit zusammen 650 Stocken blieben zur Kontrolle unbehandelt. Der Versuch wurde in fünfmaliger Wiederholung angestellt. Die Stockzahl innerhalb der Zeilen schwankte zwischen 107 und 124. Für jedes Mittel standen also etwa 550 Stöcke zur Verfügung, aus denen die im Jahre 1926 maukekrank gewesenen (= 21%) ausgewählt werden konnten. Mit jedem Mittel wurden mithin etwa 100 Stöcke behandelt. In den Jahren 1927—1929 trat die Mauke in den Versuchsparzellen so schwach auf, daß eine Auswertung nicht möglich war. In den behandelten Zeilen gingen jedoch mehr oder weniger viele Stöcke ein, und zwar nach der Behandlung mit:

10proz. Kupferkalkbruhe	im Mittel	13,7%,
dicker Kalkmilch	„ „	13,4%,
Baumwachs	„ „	9,4%,
30proz. Avenarius-Dendrin	„ „	25,9%,
20proz. Uspulun	„ „	15,0%,

während in den unbehandelt gebliebenen Zeilen nur 9,2% der Stöcke zugrunde gingen.

In den mit 30 proz. Avenarius Dendrin behandelten Zeilen ist also gegenüber unbehandelt nahezu die dreifache Menge der Stöcke abgestorben.

Die nachteilige Wirkung des Dendrinanstriches ergab sich auch in weiteren Versuchen auf der Staatsdomäne Avelsbach. Am 4. Aug. 1927 wurden an je 50 Pfropfreben Riesling × Silvaner auf Riparia 1 G. die Maukewucherungen ausgeschnitten und die Wundflächen mit 20-, 30-, 40- und 50 proz. Dendrin bepinselt, während neben jedem Versuch 5 Zeilen mit 125 ebenfalls maukekranken Stöcken zum Vergleich unbehandelt blieben. Bis zum 16. Aug. 1928 waren in den Versuchsparzellen 14, 42, 62 bzw. 68% der Stöcke eingegangen. In den Vergleichsparzellen bewegten sich die Prozentzahlen der abgestorbenen Stöcke zwischen 0,8 und 2. Es war also eine erhebliche, mit steigender Konzentration zunehmende Schädigung durch die Dendrinbehandlung eingetreten.

In einem ebenfalls auf der Staatsdomäne Avelsbach in der Zeit vom 4.—8. Aug. 1927 durchgeführten Versuch wurden maukekranke Pfropfreben ohne vorherige Entfernung der Wucherungen wie folgt behandelt:

etwa 1200	Stöcke Riesling auf	Riparia 1 G.	mit 25proz.	Dendrin
„ 1600	„ „ „	Mourvèdre × Rupestris 1202 C.	„ 25proz.	„
„ 2000	„ „ „	Gutedel × Berlandieri 41B M.G.	„ 40proz.	„

Bis zum 11. Okt. 1929 starben 31, 8 bzw. 47% der behandelten Reben ab.

In Vergleichsparzellen, in denen die maukekranken Stöcke nicht behandelt wurden, konnten in der gleichen Zeit folgende bedeutend geringeren Ausfälle ermittelt werden:

von 1518	Stocken Riesling auf	Riparia 1 G.	17%
„ 980	„ „ „	Mourvèdre × Rupestris 1202 C.	2%
„ 330	„ „ „	Gutedel × Berlandieri 41B M. G.	8'

Die Maxima und Minima der Tagestemperaturen betrugen während der Durchführung der Versuche:

27,8	28,9	31,5	28,2	27,5	23,8	25,2°
11,4	13,9	14,9	14,8	14,4	14,6	12,2°

Niederschläge wurden nur am 9. August mit 2,6 mm gemessen. In den Monaten Juni, Juli, August fielen nach den Aufschreibungen der Meteorologischen Station in Trier folgende Niederschlagsmengen (die Niederschlagswerte des 25jahr. Mittels sind jeweils in ( ) angegeben): 38,9 (63,4), 48,1 (76,5), 57,0 (76,4).

Es herrschte also vor und nach der Durchführung der Versuche eine übernormale Trockenheit, wodurch die schädigende Wirkung des Dendrins wahrscheinlich besonders deutlich in Erscheinung trat. Für eine Sommerbekämpfung der Mauke kommt nach den gesamten Versuchsergebnissen Obstbaumkarbolineum nicht in Frage.

Nach Versuchen von Lakhovsky u. a. sollen durch Pseud. tumefaciens hervorgerufene Tumoren an Pelargonien dadurch zum Absterben gebracht werden, daß man um die Pflanze einen nicht geschlossenen Kupferring isoliert aufhängt. Von diesem sollen Schwingungen ausgehen, die ausgleichend auf das gestörte Schwingungsgleichgewicht der erkrankten Zellen wirken (37). Die Versuche sind von Stapp und Bortels (183) und Schmidt (158) mit vollständig negativem Erfolg nachgeprüft worden, während nach Rivera (150) der „offene Stromkreis" einen geringen Einfluß auf Pflanzen und Tumoren ausübt.

Auch mit Röntgen- und Radiumbestrahlungen hat man Tumoren an Pflanzen mit und ohne Erfolg behandelt (86, 147—149, 151, 183). Vorläufig haben diese Versuche wohl nur theoretischen Wert. Ob die Mauke durch aktive Immunisierung der Reben bekämpft werden kann, ist heute noch unentschieden (1, 15, 16, 34).

Zur Behandlung eines maukekranken Rebstockes im Weinberg läßt sich also folgendes sagen. Sitzt die Wucherung so hoch, daß sich unter derselben noch gesunde Triebe befinden, so schneidet man den Stock nicht zu dicht unterhalb der Wucherung ab und zieht ihn von unten wieder auf. Sind keine Triebe unter der Wucherung vorhanden, so kann der Stock durch entsprechenden Schnitt in vielen Fällen zur Bildung von Bodentrieben veranlaßt und darauf entsprechend verjüngt werden. Läßt sich auch diese bereits in der alten Literatur (26, 58) angegebene Methode nicht anwenden, und ist die Wucherung so groß, daß sie den ganzen Stamm umgibt, so ersetzt man den Stock am besten durch einen neuen. Die unmittelbare Bekämpfung durch Ausschneiden der Wucherungen bis auf gesundes Holz und Bestreichen der Wunden mit Desinfektionsmitteln muß als Notbehelf betrachtet werden. Sie ist verhältnismäßig kostspielig in der Durchführung, und es kann bis jetzt kein Mittel angegeben werden, das mit Sicherheit vollen Erfolg bringt. Sind sehr viele Stöcke einer Parzelle maukekrank, so muß festgestellt werden, ob ungünstige Bodenverhältnisse, Fröste, andere Witterungsunbilden, zu kurzer Schnitt oder einseitige Düngung die Ursache bilden. Wo die Mängel nicht behoben werden können, muß der Weinbau aufgegeben werden (5).

VIII. Zusammenfassung.

Die älteste Angabe über die Mauke der Reben wurde in einer Veröffentlichung von Hörter (43) aus dem Jahre 1822 gefunden. Das häufig beschriebene Krankheitsbild konnte im allgemeinen bestätigt werden.

Eine Umfrage bei den deutschen Weinbauanstalten ergab, daß der Mauke im deutschen Weinbau keine erhebliche wirtschaftliche Bedeutung zukommt.

Wesentliche Voraussetzungen für das Auftreten sind nach hauptsächlich im Weinbaugebiet der Mosel, Saar und Ruwer durchgeführten Beob-

achtungen schwerer, bindiger Boden, Wachstumsstockungen infolge von Kälterückfällen und Hagelschäden sowie starker Rückschnitt bei einseitiger Düngung.

Aus spontan und durch Impfung entstandenen Tumoren wurden 115 Bakterienstämme gezüchtet, von denen 30% wiederum Wucherungen hervorriefen, aber die Virulenz meistens nach kurzer Zeit verloren. Übertragung auf verschiedene Nährböden hatte auf die Erhaltung der Virulenz keinen Einfluß. Die Übertragbarkeit der Mauke durch lebendes Gewebe und Arbeitsgerät unter artgleichen und nicht artgleichen Pflanzen konnte erneut bewiesen werden. Auch die Übertragung des Maukeerregers aus abgestorbenem Maukegewebe auf Freilandreben gelang. Im Infektionsversuch mit Reinkulturen von Pseudomonas tumefaciens zeigte sich die Bedeutung der Wachstumsstockung für den Verlauf der Infektion, die bei Reben noch 10 Tage nach der Verwundung möglich war. Die längste Inkubationszeit betrug bei Reben, Apfelsämlingen und Pelargonien nahezu ein Jahr. Die schon mehrfach versuchte künstliche „Verseuchung" des pflanzlichen Gewebes in größerer Entfernung von Wunden gelang nicht. Die Lebensdauer des Maukeerregers im Boden entsprach etwa dem von Muncie (115) ermittelten Wert.

Bezüglich der Größe und Wachstumsgeschwindigkeit der Tumoren verhielten sich 15 in Deutschland wirtschaftlich wichtige Rebsorten ziemlich gleichartig. Die Befallsprozente waren nach Impfungen mit sehr virulenten Stämmen ziemlich gleichmäßig, nach Impfungen mit verschiedenen Stämmen sehr ungleich und unregelmäßig hoch, so daß über Unterschiede in der Maukeanfälligkeit verschiedener Rebsorten auf Grund zahlreicher Impfungen doch kein klares Bild gewonnen werden konnte. Die Infektion war zu jeder Jahreszeit möglich, gelang im allgemeinen am besten, wenn die Pflanzen gut ernährt wurden und kräftig wuchsen. Die Entwicklung der Tumoren konnte, wie bei Stapp und Bortels (181) angegeben, durch Steigerung des vegetativen Wachstums der Pflanzen gefördert werden. Eine Beeinflussung neuer Infektionen durch bereits vorhandene Wucherungen ließ sich, soweit die Versuche ausgewertet werden konnten, nicht nachweisen.

Natürliche Ausheilung wurde an spontan erkrankten und geimpften Reben beobachtet. Ein praktisch anwendbarer, wirksamer Schutz der Weinbergsreben gegen Infektion ist bisher nicht gefunden worden. In verschiedener Weise, auch nach älteren Angaben durchgeführte Bekämpfungsversuche hatten gute und schlechte Ergebnisse und führten z. T. zu erheblichen Schädigungen der Reben. Eine Bekämpfung vorhandener Mauke erwies sich in den meisten Fällen als überflüssig, da sehr viele Stöcke auch ohne besondere Behandlung wieder gesund wurden oder durch entsprechenden Rückschnitt von den Maukewucherungen befreit werden konnten.

Schriftenverzeichnis.

1. Arnaudi, C. A., A propos de quelques expériences sur l'immunité acquise des végétaux. (Rev. Pathol. Végét. T. 14. 1927. p. 103—112.) — 2. Auler, H., Über chemische und anaerobe Tumorbildung bei Pflanzen. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 22. 1925. S. 393—403.) — 3. Babo, L. Frhr. v., Der Weinbau dargestellt nach der Reihenfolge der vorkommenden Arbeiten, nebst Anleitung zur Bereitung und weiteren Pflege des Weines. Frankfurt a. M. 1842. 518 S. — 4. Banfield, W. M., Studies on the life history of the crowngall organism. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 129.) — 5. Beinling, E., Über das Auftreten von Rebenkrankheiten im Groß-

herzogtum Baden im Jahre 1891. (Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 2. 1892. S. 207—210.) 6. Berichte der Provinzial-, Wein- und Obstbauschule zu Trier für die Jahre 1901—1912. — 7. Berthold, E., Zur Kenntnis des Verhaltens von Bakterien im Gewebe der Pflanzen. (Jahrb. wissensch. Bot. Bd. 57. 1917. S. 387—460.) — 8. Betten, R., Erziehung, Schnitt und Pflege des Weinstocks im kalteren Klima an Wänden, Spalieren und in Weinhausern. Frankfurt a. d. O. 1901. 180 S. — 9. Bittmann, O., Ein Beitrag zur künstlichen Erzeugung atypischer Zellenproliferation bei den Pflanzen. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 22. 1925. S. 291—296.) — 10. Blumenthal, F. und Hirschfeld, H., Beiträge zur Kenntnis einiger durch Bacterium tumefaciens hervorgerufenen Pflanzengeschwulste. (Ibid. Bd. 18. 1921. S. 110—125.) — 11. Blumenthal, F. und Meyer, P., Über durch Acidum lacticum erzeugte Tumoren auf Mohrrübenscheiben. (Ibid. Bd. 21. 1924. S. 250.) — 12. Blunno, M. A., Cancerous Disease of the Grape-vine. (Agric. Gazette of New South Wales. Vol. 12. 1901. p. 1079—1081, 3 pl.) — 13. Brown, N. A., Experiments with paris daisy and rose to produce resistance to crown gall. (Phytopathology. Vol. 13. 1923. p. 88—99.) — 14. Brown, N. A., The tendency of the crown-gall organism to produce roots in conjunction with tumors. (Journ. Agr. Res. Vol. 39. 1929. p. 747—766, 10 figs.) — 15. Carbone, D., Über die aktive Immunisierung der Pflanzen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 76. 1929. S. 428.) — 16. Carbone, D., et Arnaudi, C., L'immunità nelle piante. (Istit. sieroterap. milanese. Milano 1930. XII + 274 S. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 42. 1932. S. 237.) — 17. Cavara, F., Aperçu sommaire de quelques maladies de la vigne parues en Italie au 1894. (Revue internationale de viticulture et d'oenologie. T. 6. 1895. p. 447—452. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 6. 1896. S. 96—97.) — 18. Cavara, F., Intorno alla eziologia di alcune malattie di piante coltivate. (Le stationi speriment. agrar. ital. Modena. Bd. 30. 1897. p. 482—509. Ref.: Ibid. Bd. 8. 1898. p. 36—38.) — 19. Clinton, G. P., Report of the Connecticut Agric. Exp. Stat. for the year 1903. 91 S., 20 Taf. Ref.: Ibid. Bd. 16. 1906. S. 100—107. — 20. Colley, M. W., Culture experiments with Pseudomonas tumefaciens. (Amer. Journ. Bot. Vol. 18. 1931. p. 211—214.) — 21. Comes, O., Die Prophylaxis bei den Pflanzenkrankheiten. Neapel 1916. 173 S. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. 1917. Bd. 27. S. 306—311. — 22. Cook, M. T., Early stages of crown gall. (Phytopathology. Vol. 13. 1923. p. 476—482, 14 Abb.) — 23. Corvo, L. A., Sur le rôle des bacilles, dans les ravages attribués au Phylloxera vastatrix. (Cpt. Rend. Acad. Sc. Paris 1885. p. 528—531.) — 24. Cuboni, G., Patologia vegetale. Sui bacteri della rogna della vite. (Atti Reale Accad. Lincei. T. 5. 1889. p. 571—573.) — 25. Department of Agric., Cape of good hope. Failure of vines. (Agric. Journ. Cape Town. 1904. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 16. 1906. S. 110—111.) — 26. Dornfeld, J., Der rationelle Weinbau und die Weinbereitungslehre, mit einem Anhang über den Einfluß der klimatischen Verhaltnisse auf den Weinbau. Heilbronn 1864. 472 S. — 27. Elliot, Ch., Manual of Bacterial plant pathogenes. Baltimore 1930. — 28. Evans, P. J. B., Report of the Union Plant Pathologist and Mycologist for the Year 1911. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 24. 1914. S. 218—220.) 29. Friedemann, U., Bendix, Hassel und Magnus, W., Der Pflanzenkrebserreger (Bact. tumefaciens) als Erreger menschlicher Krankheiten. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh. Bd. 80. 1915. p. 114.) — 30. Friedemann, U. und Magnus, W., Das Vorkommen von Pflanzentumore erzeugenden Bakterien im kranken Menschen. (Ber. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 33. 1915. S. 96—107, 1 Taf.) — 31. Friedemann, U. und Magnus, W., Die Tumorbildung an Pflanzen. (Ztschr. f. Hyg. u. Inf.-Krankh. Bd. 80. 1915. S. 126.) — 32. Fuess, J., Wundmauke an zweijährigen Rebenveredlungen. (Wein u. Rebe. Bd. 6. 1924. S. 497—501.) — 33. Garovaglio, S. und Cattaneo, A., Studien über die herrschenden Krankheiten des Weinstockes. (Ann. d. Önologie. Bd. 8. 1880. S. 87—128.) — 34. Gäumann, E., Das Problem der Immunität im Pflanzenreich. (Schinzfestschr. Natur. Ges. Zürich. Bd. 73. 1928. Beibl. 15. S. 450—468, 5 Textfig.) — 35. Goethe, R., Mitteilungen über den schwarzen Brenner und den Grind. Berlin u. Leipzig 1878. 38 S., 24 Fig. — 36. Gleisberg, W., Der Wurzelkropf der Obstbäume. (Sächs. Gärtnerbl. Nr. 1. 1928. 11 Abb.) — 37. Gosset, A., Gutmann, A., Lakhovsky, G., et Magrou, J., Essais de thérapeutique du „Cancer expérimental des plantes". (Compt. rend. soc. biol. Paris. T. 91. 1924. p. 626—628, 2 Abb.) S. a. Lakhovsky, G., Das Geheimnis des Lebens. München 1932. 264 S. — 38. Haberlandt, G., Über Zellteilungshormone und ihre Beziehungen zur Wundheilung, Befruchtung, Parthenogenesis und Adventivembryonie. (Biol. Zentralbl. Bd. 42. 1922. S. 145—172.) — 39. Hedgcock, G. G., Field studies of the crowngall of the grape. (U. S. Dep.

Agric., Bur. Plant Ind. Bull. 183. 1910. p. 405, 4 Taf.) — 40. Heinrich, C., Die Cultur der Weinrebe im norddeutschen Klima. Berlin 1880. 48 S., 4 Taf. — 41. Hill, B. J., The migration of Bacterium tumefaciens in the tissue of tomato plants. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 553—564, 1 pl.) — 42. Hill, B. J., Brittingham, W. H., Gibbons, F. P., and Watts, G. W., Further notes on Bacterium tumefaciens and its host relationship. (Ibid. Vol. 20. 1930. p. 179—186.) — 43. Hörter, J., Der rheinländische Weinbau nach theoretisch-praktischen Grundsätzen für denkende Ökonomen. 1. Teil. Koblenz 1822. 128 S. — 44. Hörter, J., Der rheinländische Weinbau nach theoretisch-praktischen Grundsätzen, oder vollständiger Weinbau-Katechismus für Schulen, Weinbauer und Weinbergsarbeiter, nebst alphabetischer Weinbau-Terminologie. 3. Theil. Trier 1825. 169 S. — 45. Husz, B., Schützt die Beize die Obstbäume gegen den Wurzelkropf? (Kertészeti Lapok. Bd. 44. 1930. S. 96—99. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 41. 1931. S. 206—207.) — 46. Israilsky, W. P., Bakteriophagie und Pflanzenkrebs. 1. Mitt. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 67. 1927. S. 236—242.) — 47. Israilsky, W. P., Bakteriophagie und Pflanzenkrebs. II. Mitt. (Ibid. Bd. 71. 1927. S. 302—311.) — 48. Israilsky, W. P., Vergleichende Untersuchungen über die Rasseneigentümlichkeiten des B. tumefaciens und verwandter Mikroorganismen. (Ibid. Bd. 79. 1929. S. 354—370, 12 Abb.) — 49. Israilsky, W. P. und Starygin, L., Die Dissoziation bei einigen Bakterienarten. (Ibid. Bd. 81. 1930. S. 1—11.) — 50. Israilsky, W. P. und Leonowitsch, K., Dissoziation bei einigen Bakterien. II. Mitt. (Ibid. Bd. 88. 1933. S. 216—235, 4 Fig.) — 51. Ivanoff, S. S., and Riker, A. J., Studies on the movement of the crown-gall organism within the stems of tomato plants. (Phytopathology. Vol. 20. 1930. p. 817—829.) — 52. Jacovljovic, S., Histologische Untersuchungen an durch mechanische Verletzungen erzeugten Pflanzenwunden. (Glas. Serb. Akad. Wiss. I. Abt. Bd. 71. 1931. S. 129—171, 31 Fig. [Serbo-kroat.] Ref.: Bot. Centralbl. Bd. 21. 1932. S. 200.) — 53. Jensen, C. O., Von echten Geschwülsten bei Pflanzen. (Medd. f. d. kgl. Vet.- og Landbohøjskoles Serumlaboratorium. Bd. 7. 1910. S. 243—254.) — 54. Jensen, C. O., Undersøgelser vedrørende nogle svulstlignende Dannelser hos Planter. (Ibid. Bd. 54. 1918. S. 91—143.) — 55. Kaufmann, F., Zur Tumefaciens-Frage. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 28. 1928. S. 109—120.) — 56. Koch, Fr. W., Der Weinbau an der Mosel und Saar. Trier 1881. 187 S. — 57. Kofler, F., Zur Entstehung des „Grindes" der Rebe. (Schweiz. Ztschr. f. Obst- u. Weinbau. Bd. 37. 1928. S. 348—349.) — 58. Kohler, J. M., Der Weinstock und der Wein. Mit besonderer Berücksichtigung des Schweizerischen Weinbaues. Aarau 1869. 297 S. — 59. Köhler, E., Die Resistenzfrage im Lichte neuerer Forschungsergebnisse. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 78. 1929. S. 222—241.) — 60. Kölges, B., Vollständiges Handbuch der deutschen Weincultur und Weinausbildung vom Samen der Weinbeere an bis zur Essigsäurebildung des Weines. 1. Weinbau. Frankfurt a. M. 1837. 632 S. — 61. Kölges, B., Önologie oder die Lehre vom praktischen Weinbau; nach den neuesten Ansichten und Erfahrungen der vorzüglichsten Önologen Deutschlands. Berlin 1841. 310 S. — 62. Kordes, H., Neue Ergebnisse über die Entwicklung des Erregers der Mauke an Reben und des Wurzelkropfes der Obstbäume und deren Bekämpfung. (Nachr. üb. Schädlingsbek. Bd. 7. 1932. S. 59—66, 7 Abb.) — 63. Kraft, A., Der Weinstock und seine Kultur. Frauenfeld 1882. 144 S. — 64. Kroemer, K., Die Anfälligkeit der amerikanischen Rebe für Krankheiten. (Mitt. über Weinbau u. Kellerwirtschaft. Bd. 30. 1918. S. 150—156.) — 65. Kroemer, K., Beobachtungen über die Mauke der Rebe. (Wein u. Rebe. Bd. 8. 1926/27. S. 468—472.) — 66. Kroemer, K., Untersuchungen über die Mauke der veredelten Reben. (Ber. d. höh. staatl. Lehranst. f. Wein-, Obst- u. Gartenbau zu Geisenheim a. Rh. f. d. Rechnungsjahre 1922 u. 1923. Berlin 1924. S. 70—71.) — 67. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahre 1924 u. 1925. Berlin 1926. S. 133—134. — 68. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahr 1926. Berlin 1927. S. 69—70. — 69. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahr 1927. Berlin 1928. S. 42—43. — 70. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahr 1928. Berlin 1929. S. 77—80. — 71. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahr 1929. Berlin 1930. S. 84—87. — 72. Kroemer, K. und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahr 1930. Berlin 1931. S. 60—63. — 73. Kroemer, K., und Moog. Ibid. f. d. Rechnungsjahre 1931/32. Berlin 1933. S. 31. — 74. Kroemer, K. und Moog, Die Mauke der Reben. (Weinbau u. Kellerwirtschaft. Bd. 6. 1927. S. 101—104, 4 Textabb.) — 75. Kübler, J., Mittel gegen die Krankheiten, Schäden und Feinde der Reben und des Weines. Frauenfeld 1881. 131 S. — 76. Küster, E., Pathologische Pflanzenanatomie. Jena 1916. — 77. Küster, E., Über experimentell erzeugbare Gallen. (Naturw. Monatsh. Bd. 6.

1925. S. 20—29.) — 78. Küster, E., Regenerationserscheinungen an Bakteriengallen. (Flora. Bd. 20. 1926. S. 177—197, 12 Fig.) — 79. Küster, E., Anatomie der Gallen. (Handb. d. Pflanzenanat. Berlin. Bd. 5. 1930. 197 S.) — 80. Levine, M., Studies on plant cancers. IV. The effects of inoculation various quantities of different dilutions of Bacterium tumefaciens into the tobacco plant. (Bull. Torrey Bot. Club. Vol. 50. 1923. p. 231—243. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 34. 1924. S. 348.) — 81. Levine, M., Studies on plant cancers. V. Leafy crown galls on tobacco plants resulting from Bacterium tumefaciens inoculations. (Phytopathology. Vol. 13. 1923. p. 107—116.) — 82. Levine, M., The so-called strands and secondary tumors of the crown gall disease. (Phytopathology. Vol. 15. 1925. p. 435—451.) — 83. Levine, M., Morphological changes in Bacterium tumefaciens. (Science. Vol. 62. 1925. p. 424.) — 84. Levine, M., Studies on crowngall transplants. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 130.) — 85. Levin, I. and Levine, M., Malignancy of the crown gall and its analogy to animal cancer. (Journ. Cancer Res. Vol. 5. 1920. p. 243—260, 15 figs.) — 86. Levin, I., and Levine, M., The action of buried tubes of Radium emanation on neoplasias in plants. (Ibid. Vol. 7. 1922. p. 163—170, 10 Abb.) — 87. Levin, I., and Levine, M., The role of neoplasia in parasitic diseases of plants. (Ibid. Vol. 7. 1923. p. 171—178.) — 88. Lieske, R., Untersuchungen über die als Mauke oder Grind bezeichnete Erkrankung der Weinreben. (Arb. Biol. Reichsanst. Bd. 15. 1927. S. 261—270.) — 89. Lieske, R., Das Krebsproblem vom Standpunkte der Pflanzenphysiologie und der allgemeinen Bakteriologie. Vorl. Mitt. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 74. 1928. S. 395—397.) — 90. Lieske, R., Untersuchungen über die Krebskrankheit bei Pflanzen, Tieren und Menschen. (Ibid. I. Abt. Bd. 108. 1928. S. 118—146, 16 Fig.) — 91. Lieske, R., Dasselbe. II. Teil. (Ibid. Bd. 111. 1929. S. 419—425.) — 92. Liso, A., Sul significato biologico di gemmazioni normotipiche dal meristema di un tumore sperimentale. (Pathologica. No. 436. 1928. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 41. 1931. S. 280.) — 93. Löhnis, F., Landwirtschaftlich-bakteriologisches Praktikum. Berlin 1920. 165 S. — 94. Lüstner, G., Mitt. d. Kgl. Lehranstalt f. Wein-, Obst- u. Gartenbau Geisenheim a. Rh. 1907. Berlin 1908. S. 391—392. — 95. Lüstner, G., Die tierischen Feinde und Krankheiten der Rebe. (In: Babo und Mach, Handb. d. Weinbaues u. d. Kellerwirtsch. 3. Aufl. Bd. 1. Berlin 1910.) — 96. Lüstner, G., Blitzschäden in Weinbergen. (Ber. d. kgl. Lehranstalt f. Wein-, Obst- u. Gartenbau Geisenheim a. Rh. f. d. Etatsjahr 1911. Berlin 1912. S. 120—123.) — 97. Lüstner, G., In: Bericht über das Auftreten von Feinden und Krankheiten der Kulturpflanzen in der Rheinprovinz im Jahre 1913. (Veroffentlichung d. Landwirtschaftskammer f. d. Rheinprovinz. Bonn 1915 S. 38.) — 98. Lüstner, G., Dasselbe in den Jahren 1918 und 1919. (Ibid. 1920. S. 103.) — 99. Magnus, W., Der Krebs der Pelargonien. (Gartenflora. Bd. 64. 1915. S. 66—68, 2 Abb.) — 100. Magnus, W., Durch Bakterien hervorgerufene Neubildungen an Pflanzen. (Sitzungsber. Ges. naturf. Freunde. Berlin 1915. S. 263—277, Taf. 9—13.) — 101. Magnus, W., Wund-Callus und Bakterien-Tumore. (Ber. d. Dtsch. Bot. Ges. Bd. 36. 1918. S. 20—29.) — 102. Magrou, J., Tumeurs expérimentales dues au Bacterium tumefaciens (Rev. Pathol. Végét. T. 11. 1924. p. 73—77.) — 103. Magrou, J., Le Bacterium tumefaciens dans les tissus du cancer des plantes. (Cd. Rend. Acad. Sc. Paris. T. 183. 1926. p. 804—806.) — 104. Magrou, J., Sur l'anatomie du cancer des plantes ou crowngall. (Ibid. p. 986—988.) — 105. Magrou, J., Remarques sur la bactériologie et l'anatomie du crown gall. (Rev. Pathol. Végét. T. 14. 1927. p. 45—50.) — 106. Magrou, J., Recherches anatomiques et bactériologiques sur le cancer des plantes. (Ann. Inst. Pasteur. T. 41. 1927. p. 785—801.) — 107. Mareck, B. und Mareck, Fr., Der rationelle Weinbau usw. Weimar 1870. 367 S. — 108. Mohlisch, K., Wurzelkropf an Dahlien. (Rheinische Monatsschr. f. Obst-, Garten- u. Gemüsebau. Bd. 26. 1933. S. 66, 1 Abb.) — 109. Molz, E., Untersuchungen über die Chlorose der Reben. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 19. 1907. 101 S., 4 Taf.) — 110. Müller, K., Bekämpfungsversuch des Grindes am Weinstock. (Ber. d. Hauptstelle f. Pflanzenschutz in Baden f. d. Jahr 1913. Stuttgart 1914. S. 52—53, 1 Abb.) — 111. Müller, K., Rebschädlinge und ihre neuzeitliche Bekämpfung. Karlsruhe 1922. 213 S., 1 Taf., 70 Textabb. — 112. Müller, K., Bekämpfung des Grindes an Reben. (Weinbau u. Kellerwirtsch. Bd. 9. 1929. S. 5.) — 113. Müller, K., Grind des Weinstocks. (Weinbau-Lexikon. Berlin 1930. S. 306, 1 Abb.) — 114. Müller-Thurgau, Ein Schleimpilz bei dem Wurzelkropf der Birnen. (II. Jahresber. d. Versuchsstation Wädensweil 1893. S. 58.) — 115. Muncie, J. H., The effect of crown-gall on young apple and peach trees and longevity of Bacterium tumefaciens in the soil. (Phytopathology. Vol. 16. 1926. p. 79.) — 116. Nabelek,

V., Das Krebsproblem der Pflanze. Prag 1930. 40 S., 7 Taf. (Tschech. m. dtsch. Zusfassg.) — 117. Němĕc, B., Über Pflanzengeschwülste und ihre Beziehungen zu den tierischen Geschwülsten. (Tschech.) (Lékarské rozhledy. Prag. Odděl. immun. a serologie. 1913. S. 481. Ref.: Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 58. 1923. S. 164—165.) — 118. Němĕc, B., Über Pflanzentumoren. (Arch. f. exper. Zellforsch. Bd. 6. 1928. S. 172—177.) — 119. Němĕc, B., Über den Einfluß der Bakterien auf die Entwicklung des pflanzlichen Kallus. (Mém. Soc. Roy. Sci. de Bohême, cl. d. Sci. 1929. Bd. 6. Prag 1930. S. 1—17, 12 Fig.) — 120. O. V., Über den Grind der Reben. (Der Weinbote. Bd. 1. 1880. Nr. 49.) — 121. O. V., Bekämpfung der Mauke (Grind oder Krebs) der Reben. (Nachr. üb. Schädlingsbek. a. d. Abt. f. Pflanzenschutz d. Chem. Fabr. Flörsheim Dr. H. Noerdlinger. 1911. S. 9—10.) — 122. Oppenheimer, H. R., Verhütung und Heilung krebsartiger Pflanzengeschwülste. (Angew. Bot. Bd. 8. 1926. S. 8—29, 6 Textabb., 1 Taf.) — 123. Osterwalder, A., Drei Krankheiten und ein Bakterium. (Schweizer. Ztschr. f. Obst- u. Weinbau. Bd. 37. 1928. S. 176—180, 190—191, 2 Abb.) — 124. Patel, M. K., An improved method of isolating Pseudomonas tumefaciens, Sm. and Town. (Phytopathology. Vol. 16. 1926. p. 577.) — 125. Patel, M. K., Strains of Pseudomonas tumefaciens Sm. and Town. and their prevalence in various soils. (Ibid. Vol. 18. 1928. p. 129—130.) — 126. Patel, M. K., Longevity of Pseudomonas tumefaciens Sm. and Town. in various soils. (Ibid. Vol. 18. 1928. p. 124.) — 127. Patel, M. K., A study of pathogenic and non-pathogenic strains of Pseudomonas tumefaciens Sm. and Town. (Ibid. Vol. 18. 1928. p. 331—343.) — 128. Patel, M. K., Viability of certain plant pathogens in soils. (Ibid. Vol. 19. 1929. p. 295—300.) — 129. Patty, F. A., Some experiments with crown-gall bacteria. (Ibid. Vol. 20. 1930. p. 856.) — 130. Peklo, J., Über die Smithschen Rübentumoren. (Ztschr. f. Zuckerindustrie in Böhmen. Bd. 39. 1915. S. 204.) — 131. Perold, A. I. A., A treatise on viticulture. London 1927. S. 485. — 132. Pfeiffer, C., Der Grind oder die Mauke, Krebs der Reben. (Die kranke Pflanze. Bd. 2. 1925. p. 18—20.) — 133. Piaz M. A. dal, Handbuch des praktischen Weinbaues mit besonderer Berücksichtigung der Reconstruction von Weingärten und Anlage von Rebschulen. Leipzig 1898. 344 S. — 134. Piaz M. A. dal, Praktische Anleitung zur Rebenkultur im Hausgarten. Leipzig 1899. 102 S. — 135. Pinoy, P. E., A propos du cancer des plantes ou crown gall. (Cd. Rend. Acad. Sc. Paris. T. 180. 1925. p. 311—313.) — 136. Rehwald, Chr., Über pflanzliche Tumoren als vermeintliche Wirkung chemischer Reizung. (Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 37. 1927. S. 65—84, 9 Abb.) — 137. Reichert, Über die tumorerzeugenden Bakterien. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 22. 1925. S. 446—449.) — 138. Riker, A. J., Studies of crown gall. (Phytopathology. Bd. 12. 1922. p. 55—56.) — 139. Riker, A. J., Some morphological responses of the host tissue to the crown gall organism. (Journ. Agric. Res. Vol. 26. 1923. p. 425—435, 6 Taf.) — 140. Riker, A. J., The location of the crown-gall organism in its host tissues. (Phytopathology. Vol. 13. 1923. p. 43.) — 141. Riker, A. J., Some relations of the crowngall organism to its host tissue. (Journ. Agric. Res. Vol. 25. 1923. p. 119—132.) — 142. Riker, A. J., The influence of temperature and of previous infection on the development of crowngall. (Phytopathology. Vol. 15. 1925. p. 45.) — 143. Riker, A. J., Studies on the influence of some environmental factors on the development of crowngall. (Journ. Agric. Res. Vol. 32. 1926. p. 83—96.) — 144. Riker, A. J., Notes on the crowngall situation in England, France and Holland. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 289—294.) — 145. Riker, A. J., and Banfield, W. M., Studies on the development of crown gall, hairy root, and wound overgrowths in treated soil. (Ibid. Vol. 22. 1932. p. 167—177.) — 146. Riker, A. J., and Keitt, G. W., Banfield, W. M., A progress report on the control of crown gall, hairy root, and other malformations at the unions of grafted apple trees. (Ibid. Vol. 19. 1929. p. 483—486.) — 147. Rivera, V., Azione dei raggi X sopra i tumori vegetali. (Riv. di biol. Bd. 7. 1925. S. 449—465. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 38. 1928. S. 338.) — 148. Rivera, V., Guarigione di alcuni cancri con la cura dei raggi X. (R. Acad. Lincei, Roma 1925. Ser. 6. II. Fasc. 3, 4. Ref.: Bot. Centralbl. Bd. 8. 1926. S. 404.) — 149. Rivera, V., Azione di forti dosi di raggi y sopra il Bact. tumefaciens Smith et Townsend. (Rend. Accad. Lincei. Bd. 7. 1928. p. 867—869. Ser. 6. Ref.: Ibid. Bd. 15. 1929. S. 225—226.) — 150. Rivera, V., Influenza dei „circuiti aperti“ di Lakhovsky sullo sviluppo di tumori nei vegetali. (Boll. R. Staz. Patol. Veget. Bd. 8. 1928. S. 357—373, 3 Textfig. Ref.: Ibid. Bd. 14. 1929. S. 453—454.) — 151. Rivera, V., Trattamenti di tumori da „Bact. tumefaciens“ sopra „Ricinus“ con tubi di emanazione di radio. (Ibid. S. 428—444. Ref.: Die Gartenbauwissensch. Bd. 2. 1929. S. 78.) — 152. Robin-

son, W., and Walkden, H., A critical study of crown gall. (Ann. Bot. Vol. 37. 1923. p. 299—324, 4 Fig., 2 Taf.) — 153. Rosen, H. R., Morphological notes together with some ultrafiltration experiments on the crown-gall pathogene, Bakterium tumefaciens. (Mycologia. Vol. 18. 1926. p. 193—205, 2 Taf.) — 154. Rubens, J. E., Leitfaden zum Weinbau nach der Reihenfolge der Arbeiten. Hannover u. Leipzig 1875. 302 S. — 155. Rubens, J. E., Leichtfaßliche Anleitung zur Erziehung und Behandlung des Weinstocks im Weinberge, Garten, am Gebaude und im Zimmer; zur Bereitung und Behandlung des Weines etc. nebst einer systematischen Classification und Beschreibung der vorzüglichsten Traubensorten. Ein Handbuch für Freunde des Weinstocks. Mannheim 1844. 352 S. — 156. Schatzel, K., Beiträge zur Morphologie und Physiologie des bakteriellen Pflanzenkrebserregers. (Phytopath. Ztschr. Bd. 5. 1932. S. 251—273.) — 157. Schellenberg, H., Zur Behandlung der von Grind (Mauch, Räude) befallenen Reben. (Landw. Jahrb. Schweiz. Bern 1910. S. 328—330.) — 158. Schmidt, G. W., Experimentelle Untersuchungen über die Entstehung des Pflanzenkrebses. (Schweiz. Ztschr. f. Hygiene. 1933. H. 2.) — 159. Seucker, Schweizer. landwirtschaftl. Ztschr. Bd. 9. 1881. S. 524. Ref.: Oenologischer Jahresber. Bd. 4. 1881. S. 64. — 160. Sherbakoff, C. K., Effect of soil treatment with sulphur upon crowngall in nursery apple trees. (Phytopathology. Vol. 15. 1925. p. 105—109.) — 161. Siegler, E. A., The woolly-knot type of crown gall. (Journ. Agric. Res. Vol. 39. 1929. p. 427—450.) — 162. Siegler, E. A., and Piper, R. B., Pathogenesis in the woolly-knot of crown gall. (Ibid. Vol. 43. 1931. p. 985—1002.) — 163. Smith, E. F., Crown gall and sarcoma. (Ztschr. f. Krebsforschung. Bd. 11. 1911. S. 137—183.) — 164. Smith, E. F., Pflanzenkrebs versus Menschenkrebs. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 34. 1912. S. 394.) — 165. Smith, E. F., Crown gall studies showing changes in plant structures due to a changed stimulus. (Journ. Agric. Res. Vol. 6. 1916. p. 179—182, pl. 18—23.) — 166. Smith, E. F., Mechanism of tumor growth in crown-gall. (Ibid. Vol. 8. 1917. p. 165—188, Taf. 4—65.) — 167. Smith, E. F., Embryomas in plants (produced by bacterial inoculations). (Johns Hopkins Hosp. Bull. Vol. 28. 1917. p. 277—294, 115 figs. on pl. 26—53. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 33. 1923. S. 181—182.) — 168. Smith, E. F., An Introduction to bacterial Diseases of Plants. Philadelphia u. London 1920. XXX + 688 S.. 453 Fig. — 169. Smith, E. F., Fasciation and Prolepsis due tu Crown-Gall. (Phytopathology. Vol. 12. 1922. p. 265—270, Taf. 16—20.) — 170. Smith, E. F., Appositional growth in Crown-Gall Tumors and in Cancers. (Journ. of Cancer Res. Vol. 7. 1922. p. 1—49. 28 Taf.) — 171. Smith, E. F., Twentieth century advances in cancer research. (Journ. of Radiology. Vol. 4. 1923. p. 295—317, 8 fig.) — 172. Smith, E. F., Le Crown-Gall. (Rev. Pathol. Végét. Vol. 11. 1924. p. 219—253.) — 173. Smith, E. F., Cancer in plants and in man. (Science. Vol. 61. 1925. p. 419—420.) — 174. Smith, E. F., Brown, N. A., and McCulloch, L., The structure and development of crown gall; a plant cancer. (U. S. Dept. of Agric. Bur. of Plant industr. Bull. 255. 1912. p. 1—60, 59 Taf.) 175. Smith, E. F., Brown, N. A., and Townsend, C. O., Crown-Gall of Plants; its cause and remedy. (Ibid. Bull. 213. 1911. 215 pp.) — 176. Smith, E. F., and Quirk, A. J., A begonia immune to crowngall. With observations on other immune or semi-immune plants. (Phytopathology. Vol. 16. 1926. p. 491—508.) — 177. Smith, E. F., and Townsend, C. O., A plant tumor of bacterial origin. (Science. Vol. 25. 1907. p. 671—673.) — 178. Stapp, C., Der bakterielle Pflanzenkrebs und seine Beziehungen zum tierischen und menschlichen Krebs. (Ber. Dtsch. Bot. Gesellsch. Bd. 45. 1927. S. 480—504, 4 Taf.) — 179. Stapp, C., Der Wurzelkropf oder Bakterienkrebs der Obstbäume und seine Bekämpfung. (Flugblatt Nr. 78 d. Biol. Reichsanst. f. Land- u. Forstwirtsch. 1928.) — 180. Stapp, C., Zur Bekämpfung der Mauke der Reben. (Angew. Bot. Bd. 11. 1929. S. 333—341, 3 Abb.) — 181. Stapp, C., und Bortels, H., Der Pflanzenkrebs und sein Erreger, Pseudomonas tumefaciens. I. Mitt.: Konstitution und Tumorbildung der Wirtspflanze. (Ztschr. f. Parasitenkunde. Bd. 3. 1931. p. 654—663.) — 182. Stapp, C. und Bortels, H., Dasselbe. II. Mitt.: Über den Lebenskreislauf von Pseudomonas tumefaciens. (Ibid., Bd. 4. 1931. p. 101—125, 24 Abb.) — 183. Stapp, C. und Bortels, H., Dasselbe. III. Mitt.: Zur Frage der Bekämpfung. (Zentralbl. f. Bakt. Bd. 88. 1933. S. 313—319, 6 Abb.) — 184. Stapp, C. und Ruschmann, G., Zur Biologie von Azotobakter. (Arb. Biol. Reichsanst. Bd. 13. 1925. S. 314.) — 185. Steeb, Faßliche Anleitung zum Weinbau mit besonderer Rücksicht auf die neueren Verbesserungen, zunächst für die Weingärtner Württembergs bestimmt. Reutlingen 1831. 115 S. — 186. Teutschländer und Kronenberger, Fr., Über Versuche mit Bacterium tumefaciens. (Ztschr.

f. Krebsforschung. Bd. 23. 1926. S. 178—182.) — 187. Toumey, J. W., An Inquiry into the Cause and Nature of Crown-Gall. (Publ. Univ. Arizona Agric. Exp. Stat. Bull. No. 33. Washington 1900. 64 pp., 31 figs. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 11. 1901. S. 143—145.) — 188. Viala, P., Les Maladies de la Vigne. Montpellier u. Paris 1893. 595 S., 20 Taf. — 189. Weigelt, C., Saare, O. und Portele, K., Önologischer Jahresbericht. Bericht über die Fortschritte in Wissenschaft und Praxis auf dem Gesamtgebiete von Rebbau, Weinbereitung und Kellerwirtschaft. Bd. 4. 1881. 154 S. — 190. Wilhelm, A. F., Experimentelle Untersuchungen über die Kälteresistenz von Reben und Obstgehölzen. (Gartenbauwissenschaft. Bd. 8. 1933. S. 77—111.) — 191. Woloschinowa, B., Zur Frage der Bekämpfung des Wurzelkropfes der Obstbäume. (Ztschr. f. Garten-, Wein- u. Gemüsebau. Bd. 12. Charkow 1927. S. 514—519. [Russ.] Ref.: Bot. Centralbl. Bd. 12. 1928. S. 373.) — 192. Wright, W. H., Hendrickson, A. A., and Riker, A. I., Studies on the progeny of single-cell isolations from the hairy-root and crown-gall organisms. (Journ. Agric. Res. Vol. 41. 1930. S. 541—547.) — 193. Wright, W. H., and Skorig, V., The demonstration of bacteria in plants tissues by means of the Giemsa stain. (Phytopathology. Vol. 18. 1928. p. 803—807.) — 194. Zacharewicz, E., Les Broussins dans les vigne de Vaucluse. (Revue internationale de viticulture. T. 1. 1894. p. 119—120. Ref.: Ztschr. f. Pflanzenkrankh. Bd. 5. 1895. S. 302—303.) — 195. Zillig, H., Versuche mit neuen Pflanzenschutzmitteln im Weinbau im Jahre 1922. (Weinbau u. Kellerwirtsch. Bd. 2. 1923. S. 45—46, 49—57, 62—63.) — 196. Zillig, H., Witterung, Weinbau und Rebschädlinge an Mosel, Saar und Ruwer im Jahre 1923. (Ibid. Bd. 3. 1924. S. 7—10, 17.) — 197. Zillig, H., Witterung, Weinbau und Rebschädlingsbekämpfung an Mosel, Saar und Ruwer im Jahre 1924. (Ibid. Bd. 4. 1925. S. 31—36, 44—47.) — 198. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1925. (Ibid. Bd. 5. 1926. S. 63—66.) — 199. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1926. (Ibid. Bd. 6. 1927. S. 43—49.) — 200. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1927. (Ibid. Bd. 7. 1928. S. 35—36, 41—44.) — 201. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1928. (Ibid. Bd. 8. 1929. S. 9—13, 18—19.) — 202. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1929. (Der Deutsche Weinbau. Bd. 9. 1930. S. 62—65.) — 203. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1930. (Ibid. Bd. 10. 1931. S. 192—196.) — 204. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1931. (Ibid. Bd. 11. 1932. S. 134—135, 141—143, 150—151.) — 205. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1932. (Weinbau u. Kellerwirtschaft. Bd. 12. 1933. S. 203—205, 215—217.) — 206. Zillig, H. und Niemeyer, L., Dasselbe im Jahre 1933. (Das Weinland. Bd. 6. 1934. 223—225, 258—262.) — 207. Zillig, H. und Herschler, A., Bodenuntersuchungen zur Klärung von Wachstumsstörungen an Reben im Weinbaugebiet der Mosel, Saar und Ruwer. (Arb. Biol. Reichsanst. Bd. 18. 1931. S. 507—581.)

Nachdruck verboten.

Über die Bildung neuer Rassen bei Zygosaccharomyces mandshuricus Saito unter dem Einfluß der Radiumemanation.

[Aus dem Mikrobiol. Laboratorium des Staatsinstituts für Röntgenologie und Radiologie in Leningrad.)

Von J. M. Olenov.

Mit 5 Abbildungen im Text.

Durch die Einwirkung von Radiumemanation auf die Hefe Zygosaccharomyces mandshuricus Saito erhielten wir eine Reihe neuer Rassen dieses Pilzes. Unsere Arbeit bildet eines der Glieder einer Reihe von Untersuchungen, die unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. A. Nadson durchgeführt wurden, und zur Aufklärung der Gesetzmäßigkeit experimenteller Rassenbildung bei niederen Pflanzenorganismen dienen. Schon im Jahre 1924 zeigten Nadson und Philippov, daß unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen die Bildung neuer Rassen bei den Schimmelpilzen beobachtet wird. Im Jahre 1926 erhielten diese Autoren unter der Wirkung von Röntgenstrahlen auf die Hefe Nadsonia fulvescens eine neue asporogene Rasse. Weitere, auch von Nadson und Philippov mit demselben Organismus und auch mit Rosahefe (deren systematische Stellung durch die von den Röntgenstrahlen hervorgerufenen Veränderungen der Ausgangsform präzisiert werden konnte) durchgeführte Versuche gaben den Verff. die Möglichkeit, eine Reihe wichtiger Behauptungen aufzustellen. Unter dem Einfluß der Röntgenstrahlen auf Rosahefe entstand eine neue Rasse (sie ist, wie auch alle folgenden, aus einer Einzellkultur gewonnen worden), die sich, allen ihren Eigenschaften nach, nicht von dem von Kluyver und van Niel im Jahre 1924 beschriebenen Pilze Sporobolomyces roseus unterscheidet. Der Entwicklungszyklus dieser neuen Rasse ist viel komplizierter als derjenige der Ausgangsrasse (Rosahefe). Weiterhin wurden auf gleichem Wege, und besonders bei wiederholter Bestrahlung, zahlreiche neue Rassen erhalten, die ihre unterscheidenden Merkmale, selbst nach ungefähr zehnmaliger Überimpfung auf die verschiedensten Nährböden, beständig beibehielten; in keinem Falle wurde eine Rückkehr zu den ursprünglichen Eigenschaften konstatiert. Die Oberfläche der Kolonien, welche bei der Ausgangsform glatt ist, wird bei den experimentell erhaltenen Rassen zuerst höckerig, alsdann faltig und endlich, bei weiterer Bestrahlung, borstig. Die Farbe der Kolonien verändert sich gleichfalls infolge einer Schwächung der Pigmentbildungsfunktion, bis zum vollständigen Pigmentverlust (weiße Rassen). Die meisten Röntgenrassen unterscheiden sich voneinander und von der Ausgangsform durch einen ganzen Komplex morphologischer und physiologischer Eigenschaften. Durch Bestrahlung von Nadsonia fulvescens wurden gleichfalls neue Rassen erhalten, die ihrer Mannigfaltigkeit nach den Röntgenrassen des Sporobolomyces nicht nachstanden.

In einer späteren Arbeit von Nadson und Philippov (1932) wird der Weg zur Lösung der wichtigen Fragen über die Rolle der Dosierung

und der relativen Stabilität verschiedener jüngst aus der Natur isolierter Rassen einerseits, und der im Laboratorium längere Zeit gezüchteten Röntgenrassen anderseits, hinsichtlich der rassenbildenden Wirkung der Röntgenstrahlen markiert.

Die genannte Frage wird ausführlich in einer Arbeit von Philippov (1932), welcher sich die Kontrolle und eine weitere Ausarbeitung der früher erhaltenen Resultate an einem anderen Objekt — der Rosahefe Torulopsis glutinis, zum Ziele gestellt hatte, besprochen. Der Verf. stellt Vergleiche zwischen den aus der Natur isolierten und den experimentell erhaltenen Rassen an, und gelangt zur Überzeugung, daß diese Rassen ihrer systematischen Stellung nach identisch sind.

Nadson und Rochlina (1933) erhielten ähnliche Resultate, aber dieses Mal nicht durch Einwirkenlassen von Röntgenstrahlen, sondern von Radiumemanation. Als Ausgangsform diente die Rasse Saccharomyces cerevisiae, welche in der Branntwein- und Hefefabrikation verwendet wird.

Die Versuchsergebnisse der obenerwähnten Arbeit tragen zur Lösung von Problemen der Evolutionstheorie, der Phylogenie und Systematik der niederen Pflanzenorganismen bei. Es ist durchaus nötig, dieselben Experimente noch mit einer Reihe anderer Organismen vorzunehmen. Die sich ansammelnden Versuchsergebnisse werden es ermoglichen, allgemeingültige Hypothesen aufzustellen.

Das Objekt und die Methodik.

Die Hefe Zygosaccharomyces mandshuricus, die Saito im Jahre 1914 aus einem einheimischen mandschurischen Getränk isoliert hatte, wurde der Radiumbestrahlung unterworfen. Die Kultur stammte aus dem Mikrobiologischen Laboratorium der Akademie der Wissenschaften der UdSSR. Zur Arbeit wurde eine reine, unter mikroskopischer Kontrolle aus einer Zelle isolierte Kultur verwendet. Von den unter dem Einfluß der Bestrahlung veränderten Kulturen wurden wiederum Einzellkulturen hergestellt. Als Nährboden dienten Würzeagar (Bierwürze + 2% Agar; p_H 4,8—5,2) und Würze. Beim Studium der fermentativen Eigenschaften wurde Hansens Nährlösung mit 5% verschiedener Kohlehydrate verwendet. Außer einer quantitativen Bestimmung der Kohlensäure (CO_2) wurde noch direkt der Alkoholgehalt der vergorenen Flüssigkeit nach Nicolou bestimmt. Zur Untersuchung der Sporenbildung wurde außer Hansens Lösung, der Würze und dem Würzeagar, noch das Substrat von Gorodkowa, Gipsblöcke in Wasser oder Würze, Agar mit Wasser ohne Zugabe von Nährstoffen und alkalische Fleischpeptonagar versucht. Die Kultur wurde im Wärmeschrank bei 22—24° C gehalten.

Als Strahlenquelle wurde Radiumemanation in Glaskapillaren verwendet; da die α-Strahlen fast gänzlich vom Glase des Kapillars aufgehalten werden, so wird der ganze Effekt bei dieser Methodik durch die β- und γ-Strahlen bedingt. Die Kapillare wurden unmittelbar auf den Nährboden ins Zentrum der mit Hefe beschickten Petrischale gelegt und nach 1—4 Tagen entfernt. Die Bestrahlung wurde bei Zimmertemperatur durchgeführt. Als Kontrolle dienten mit derselben Kultur und gleich dicht besäte Schalen ohne Radiumkapillare. Aus jeder Kolonie der Versuchsschalen wurde Material zur mikroskopischen Untersuchung entnommen; falls bei der mikroskopischen Untersuchung der bestrahlten Kolonien Veränderungen wahr-

genommen wurden oder die Kolonien selbst sich ihrer Form nach von den ursprünglichen Kolonien der zu den Versuchen dienenden Rasse unterschieden, wurde zuerst eine Plattenkultur und nur nachdem eine Einzell-Kultur hergestellt. Die Gesamtzahl der mikroskopisch untersuchten Kolonien in allen Versuchsschalen betrug 5376 und eine dementsprechende Anzahl Kolonien wurde aus den Kontrollschalen untersucht.

Die Resultate der Bestrahlung.

Während der Dauer der ganzen Arbeit wurden in den Kolonien der Kontrollschalen niemals irgendwelche Abweichungen von der Norm wahrgenommen.

Erbliche Veränderungen sind bei unserem Objekt bei der Anwendung von Dosen, welche 3,0 m. e. d. überschreiten, erhalten worden. Um jedoch erhebliche erbliche Veränderungen hervorzurufen, mußte man zur wiederholten Bestrahlung wenig veränderter Rassen, welche der Ausgangsrasse genetisch noch nahestehen, greifen. Unsere Ausgangsrasse Zygosaccharomyces mandshuricus erwies sich der Wirkung der β- und γ-Strahlen der Radiumemanation gegenüber als sehr stabil[1]): zur Bildung unserer Rasse E, welche, zum Unterschied von der Ausgangsrasse A (und der ihr nahestehenden Rassen B, C_I, C_{II}, D, siehe weiter), faltige Kolonien bildet, war nur eine 4malige Bestrahlung notwendig. Beim Summieren der angewandten Dosen erhalten wir die Zahl 18,73 m. e. d., welche die Dosis, die bei einmaliger Bestrahlung letal ist, weit überschreitet. Dies beweist, daß die Resultate sogar zahlreicher Bestrahlungen der Ausgangsform uns noch kein volles Bild der erblichen Veränderungen des Organismus geben. Die letale Dosis ist die natürliche Grenze unserer Möglichkeiten bei einmaliger Bestrahlung. Bei wiederholten Bestrahlungen haben wir die Möglichkeit, die Grenzen der Wirkung stark zu erweitern. Auf diese Weise, d. h. bei wiederholten Bestrahlungen, erhielten wir endlich 15 neue Rassen, die sich voneinander und von der Ausgangsrasse unterscheiden (siehe Abb. 1 und Tab. 1). Es ist möglich, daß auf solche Weise erhebliche erbliche Veränderungen, auch bei anderen konstanten Organismen, hervorgerufen werden können.

Abb. 1. Die Abstammung der Rassen von Zygosaccharomyces mandshuricus. Mit ununterbrochenen Linien sind die unter dem Einfluß der Bestrahlung entstandenen Rassen verbunden. Die Punktlinie führt zu den „spontan“ entstandenen Rassen.

[1]) Unsere Rasse Zygosaccharomyces mandshuricus bildet in dieser Hinsicht keine Ausnahme, wie es aus den Angaben von Nadson und Philippow zu ersehen ist, welche zeigen, daß Saccharomyces ellipsoideus und Schizosaccharomyces octosporus der Wirkung der Röntgenstrahlen gegenüber sehr stabil sind, d. h. keine neuen Rassen bilden.

Tabelle 1.

Bezeichnung der Rasse	Entstanden aus Rasse	Zahl der Bestrahlungen der Ausgangsrassen und die verwendeten Dosen in m. c. d.	Gesamtzahl d. Kolonien in den Versuchsschalen der Rasse, aus welchen die gegeb. Rasse entstanden ist	Dosis, bei welcher die gegeb. Rasse entstanden ist, in m. c. d.	Zahl der Kolonien in der Schale bei der Entstehung der Rasse	Zahl der Kolonien, welche Zellen der neuen Rasse enthielten	Entfernung dieser Kolonien von der Kapillare	Die Größe des Winkels, der durch die Kapillare und eine Gerade aus dem Zentrum der Kapillare zu der veränderten Kolonie gebildet wird	% der Kolonien der neuen Rasse bei der Aussaat aus einer Kolonie, welche Zellen der neuen Rasse enthielt	Zeitpunkt der Entstehung der neuen Rasse	Zahl der Überimpfungen (bis zum 1. V. 1934)
A	Ausgangsrasse	—	—	—	—	—	—	—	—	IX. 1932	52
B	f. A	27 0.37—7.34	1863	f. 3.24 h. 4.29	116	1	1,3	55°	100	XI. 1932	48
C_{I}	f. B	8 0,47—5,57	511	3.03	89	1	3,4	15°	100	I. 1933	42
C_{II}	f. B	ebenso	ebenso	ebenso	ebenso	1	3,6	20°	100	I. 1933	42
D	f. C_{II}	9 1,25—8,18	626	8.18	10	1	2,7	85°	100	I. 1933	42
E_{I}	f. D	5 2,39—7.19	460	3.55	32	1	3,9	15°	50	II. 1933	39
F	f. E_{I}	31 1,16—10,02	1916	6.25	46	1	2,8	70°	100	III. 1933	36
G_{I}	ebenso	ebenso	ebenso	6.92	379	1	4,3	5°	20	III. 1933	36
G_{II}	,,	,,	,,	ebenso	ebenso	3	1,9	30°	4	III. 1933	36
G_{III}	,,	,,	,,	,, außerdem 5.65	,,	1	1,6	35°	100	III. 1933	36
H	,,	,,	,,	4,73	4	1	4,0	30°	100	III. 1933	36
I_{I}	,,	,,	,,	5.65	123	1	0,9	80°	100	III. 1933	36
I_{II}	,,	,,	,,	ebenso	ebenso	1	2,2	15°	100	III. 1933	36
L	,,	,,	,,	4,67	61	1	2,2	40°	100	III. 1933	36
M	,,	,,	,,	4,84	9	1	4,3	10°	1	III. 1933	36
O	f. H	„spontan“ entstand. ist	—	—	—	—	—	—	—	V. 1933	36
P	ebenso	ebenso	—	—	—	—	—	—	—	V. 1933	36

Einige von den entstandenen Rassen bilden ihrerseits neue Rassen schon ohne Einwirkung von Radiumemanation. Es liegt die sog. „spontane“ Bildung neuer erblicher Eigenschaften vor, während bei der Ausgangsrasse nie „spontane“ erbliche Veränderungen beobachtet wurden. Es läßt sich hier eine bestimmte Reihenfolge wahrnehmen. Der Ausgangsstamm wurde in 27 Versuchen (die Gesamtzahl der untersuchten Kolonien beträgt 1863) bestrahlt und dabei ist nur eine neue Rasse B, welche sich wenig von der Ausgangsrasse unterscheidet, erhalten. Die erste Rasse mit faltiger Oberfläche (E_I) wurde in 31 Versuchen bestrahlt (die Gesamtzahl der untersuchten Kolonien beträgt 1916) und ergab 9 neue Rassen. Schließlich gaben zwei von diesen Rassen (H und L) neue Rassen schon ohne Bestrahlung, in Form von Sektoren der Riesenkolonien; die Struktur der Oberfläche dieser Sektoren unterschied sich vom übrigen Teile der Kolonie (Abb. 2). Später beobachten wir noch einen Fall von „spontaner“ Bildung einer neuen Rasse in Form eines Sektors der Riesenkolonie der Rasse I_I. Folglich sind einige von den unter dem Einfluß der Bestrahlung entstandenen Rassen viel leichter zu verändern, als die Ausgangsform. Es gibt zwei Moglichkeiten zur Erklärung dieser Tatsache. Entweder treten bei einigen von den neuen Rassen, im Vergleich zur Ausgangsrasse, erbliche Veränderungen häufiger auf, oder vermehrt sich ein Teil der Zellen, welche eine Veränderung erlitten haben, zum Unterschied von denselben der Ausgangsrasse, so schnell, daß ihre Nachkommenschaft sich als Sektor einer Riesenkolonie bemerkbar macht. Augenblicklich haben wir noch nicht genug Material zur Losung dieser schwierigen und komplizierten Frage.

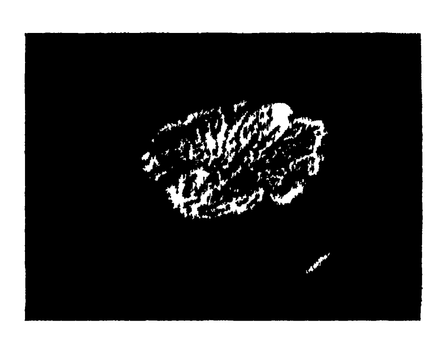


Abb 2. Die „spontan“ entstandene Rasse Q als Sektor einer Kolonie der Rasse L (der obere Teil mit intensiverem Wachstum).

Da es hier unmoglich ist, eine ausführliche Beschreibung aller unserer Rassen zu geben, die wir sowohl bei der Bestrahlung als auch durch „spontane“ Bildung erhalten haben, so werden wir uns nur kurz bei einigen wichtigsten Momenten aufhalten.

Form und Größe der Kolonien (Abb. 3). Die vollkommen runden Kolonien der Ausgangsrasse A haben eine glatte Oberfläche und erreichen bei verhältnismäßig langsamer Entwicklung bei Zimmertemperatur nach 12—13 Tagen eine Große von 1 cm im Durchmesser. Die Rassen B, C_I, C_{II}, D unterscheiden sich makroskopisch nicht von der Stammrasse A. Die Kolonien der Rasse E_I mit faltiger Oberfläche wachsen viel schneller, als die der glatten Rassen B—D und erreichen größere Dimensionen. Das glatte Zentrum der Kolonien ist etwas gewölbt. Die äußere Zone hat radiale Falten. Die Ränder der Kolonie sind gewellt. Bei der aus der Rasse E_I entstandenen Rasse G_I sind die Kolonien wieder glatt (mit kleinen, runden Vertiefungen im Zentrum), aber bedeutend größer, als bei den Rassen A—D, jedoch etwas kleiner, als bei der Rasse E_I. Die Kolonien der übrigen aus der Rasse E_I entstandenen Rassen wachsen auch bedeutend schneller, als bei den Rassen A—D und erlangen größere Dimensionen (mit Ausnahme von Rasse L). Die Struktur der Kolonieoberfläche ist verschieden. Außer

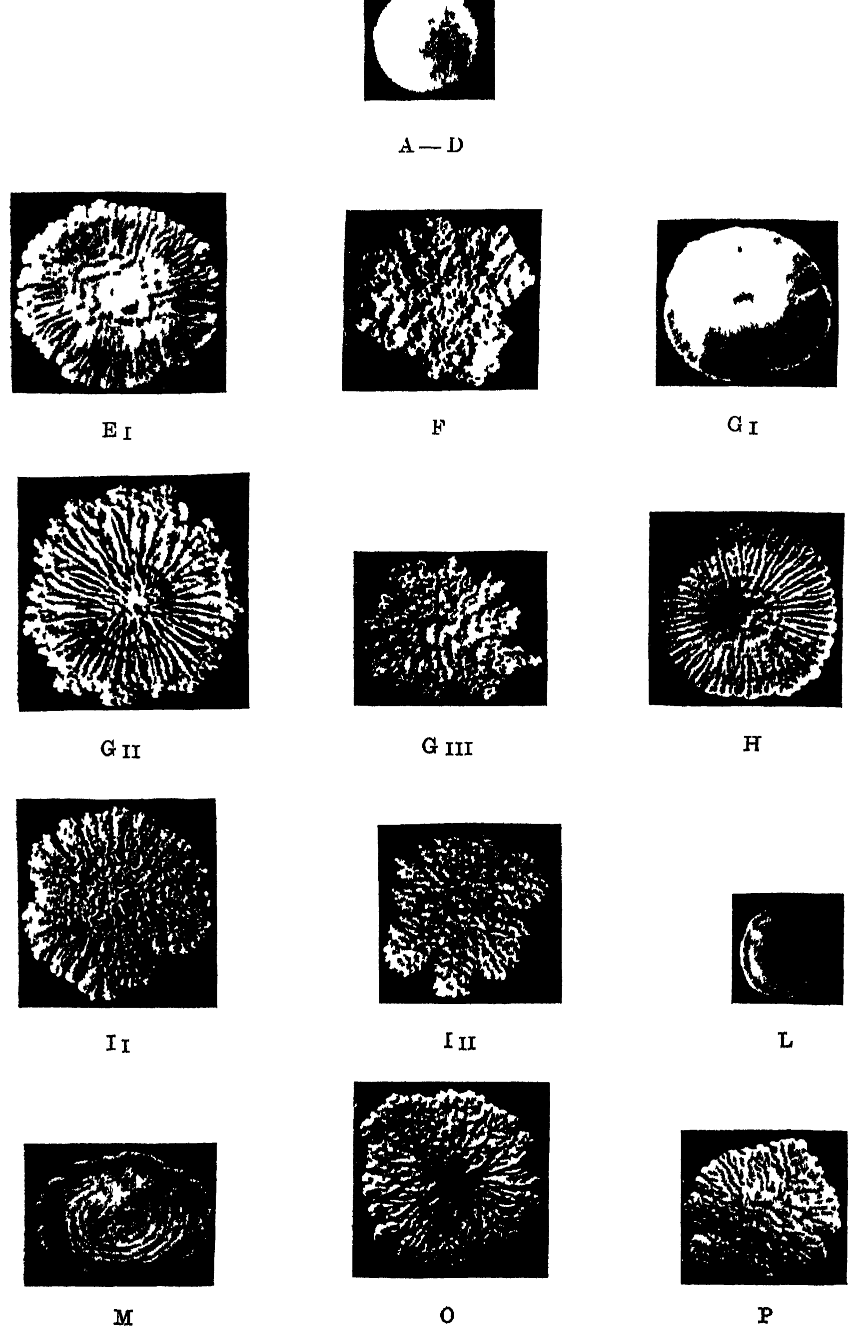


Abb. 3. 17 tagige Kolonien der Rassen d. Zygosaccharomyces mandshuricus auf Wurzeagar (bei 24° C). Oben die Ausgangsrasse A (die Rassen B, C_I, C_{II}, D unterscheiden sich von derselben weder der Große, noch der Form nach nicht).

den Formen mit mehr oder weniger feinen radialen Falten (Rassen G_{III}, H, I_{I}, O) erhielten wir noch grobfaltige Kolonien (Rasse F), ferner Kolonien, deren Falten keine bestimmte Richtung haben (Rasse P), feine häutige Kolonien mit scharfgezackten Rändern (Rasse G_{III}) und auch spiralfaltige mit glatten Rändern (Rasse M) oder mit radialer Zeichnung der Peripherie (Rasse I_{II}). Zuweilen bilden sich die Falten sehr spät und sind schwach ausgeprägt (Rasse L).

Form und Größe der Zellen. Zellverbände (Abb. 4). (Kolonien auf Wurzeagar.) Bei der Ausgangsrasse A und auch bei Rasse B sind die Zellen vorzugsweise oval, 6—8 μ lang und 4—6 μ breit, größtenteils mit einem Sproß. Die Vakuolen sind nicht scharf ausgeprägt. Die Sprossen sind, sogar in sehr alten Kulturen, sehr selten. Bei der Rasse C_{I} hat ein bedeu-

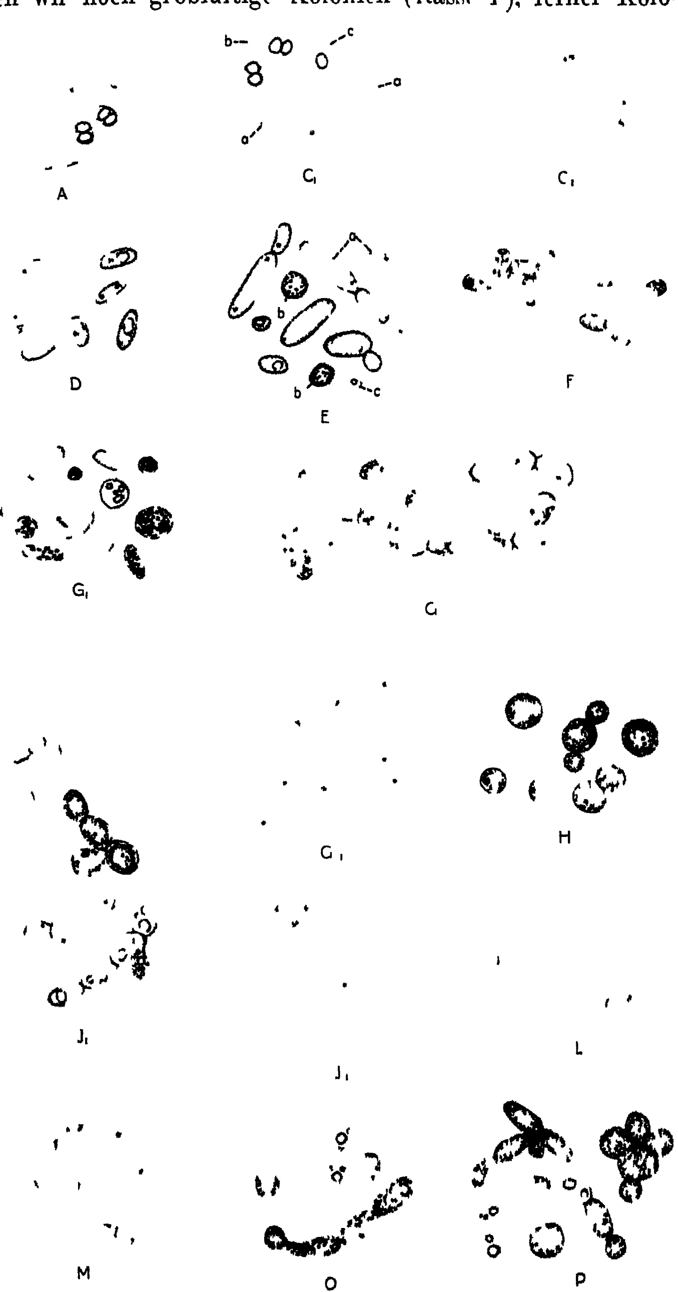


Abb. 4. Die Rassen des Zygosaccharomyces. Form und Größe der Zellen aus 17 tägigen Kolonien auf Wurzeagar (bei 24° C). Die Rasse B ist nicht dargestellt, weil sie sich nur durch üppigere Sporenbildung von der Rasse A unterscheidet. Vergrößerung 500×.

tender Teil der Zellen, besonders in alten Kulturen, eine amöbenartige Form mit 1—3 Zellauswüchsen. Die Zellen aus der Kolonie der Rasse C_{II} sind etwas größer als bei den Rassen A und B; sie haben fast immer verhältnismäßig große, scharf konturierte Vakuolen. Bei der Rasse D kommen selbst in jungen Kulturen Zellen vor, die 1½—2 mal größer sind als die der Rasse A. Es werden auch, obwohl nicht oft, kurze, aus 2—3 Zellen bestehende Ketten beobachtet. Die Zellen der Rasse E_I sind noch größer als die der Rasse C_{II}. Es werden je einige Zellenketten in jedem Gesichtsfeld wahrgenommen. Bei der Rasse G_I kommen. außer kleinen Anhäufungen von aus ausgestreckten Zellen bestehenden Ketten, unter denen ovale Zellen vorwiegend, auch sehr große, runde Zellen vor, die (in jungen Kulturen) nur eine dünne Plasmaschicht, welche eine große, runde Vakuole umgibt, aufweisen. Die anderen, aus der Rasse E_I entstandenen Rassen, haben sehr kleine, runde Zellen (Rasse L), etwas größere (Rasse G_{III}), große runde Zellen (Rasse M), lange Ketten aus gestreckten Zellen, zuweilen mit Seitensprossen (Rassen F, G_{II}) und amobenartige Zellen mit einem Zellauswuchs (bei der Rasse I_{II}). Bei der Rasse 0 kommen. außer kleinen runden Zellen, gewöhnlich noch lange Ketten und einzelne ovale Zellen vor. Dieselben Zelltypen werden auch bei der Rasse P beobachtet, doch sind hier hauptsächlich sehr lange Ketten aus gestreckten Zellen vorhanden. Die Rasse I_I wird durch üppige Sprossung an einem Zellpol charakterisiert; verschieden gelagerte Tochterzellen bilden eigentümliche Figuren.

Der Zellinhalt. Die Rassen unterscheiden sich nach dem Gehalt an Metachromatinkörnern nicht wesentlich voneinander. Die Rassen A und B sind viel reicher an Glykogen als alle übrigen. In den Zellen der Rassen A und B ist wenig Fett enthalten, in denjenigen der Rassen C_I, C_{II} und D etwas mehr. Die Fettbildung ist sehr beträchtlich bei der Rasse E_I mit faltiger Oberflächenstruktur. Bei den Rassen. die sich bei wiederholten Bestrahlungen und auch „spontan" gebildet haben, findet eine geringe Vermehrung der Fettmenge statt. Besonders wenig Fett haben die Rassen G_{III} und L, die sich in dieser Hinsicht von den Rassen C_I, C_{II} und D nicht unterscheiden.

Die Sporenbildung. Bei der Ausgangsrasse A folgt nach typischer isogamer Kopulation eine Askusbildung. Der Askus enthält 4, selten weniger Sporen. Parthenogenese kommt bei der Sporenbildung selten vor. Die Rasse B sporuliert bedeutend leichter und üppiger. als die Rasse A. Bei den amöbenartigen Zellen der Rasse C_I ist die Kopulation selten, die reifen Asken haben gleichfalls einen unregelmäßigen Umriß. Die ziemlich geringe Sporenbildung geht vorzugsweise parthenogenetisch vor sich. In den parthenogenetischen Asken ist größtenteils nur eine Spore enthalten. Die Rassen E_I und alle aus derselben entstandenen Rassen sind asporogen. Die Kopulation fehlt bei ihnen gleichfalls.

Die Widerstandsfähigkeit hohen Temperaturen gegenüber. Ein sehr geringer Teil der Zellen einiger neuer Rassen (G_{II}, H, O, P), die genetisch der Ausgangsrasse am fernsten stehen, können ein 10 Min. langes Erwärmen bis zu 60° C aushalten, während die Ausgangsrasse A und die ihr nahen Rassen B—D schon bei einem 10 Min. langen Erwärmen bis zu 55° C zugrunde gehen.

Fermentative Eigenschaften. Zygosaccharomyces mandshuricus vergärt, nach den Angaben von Saito, die von Stelling-Dekker (1931) bestätigt worden sind, Dextrose, Lävulose und Saccharose (die Vergärung von Raffinose bezweifelt Stelling-

Dekker). Wir haben die Fähigkeit unseres Ausgangsstammes Zygosaccharomyces mandshuricus auf die Vergärbarkeit folgender Kohlenhydrate untersucht: Dextrose, Lävulose, Galaktose, Saccharose, Maltose, Laktose und Dextrin. Wie zu erwarten war, vergärt die Ausgangsrasse nur Dextrose, Lävulose und Saccharose. Die Vergärung von Hansens Lösung, die Saccharose enthält, geht selbst bei 22° C ziemlich schwach vonstatten. Bei 14—16° C verläuft die Gärung noch schwerer; zuweilen gärt die Saccharose überhaupt nicht oder die Gärung bricht ab, wenn sie kaum begonnen. Das ist eine Folge der dauernden Kultivierung unseres Stammes im Laboratorium. Bekanntlich werden bei vielen Mikroorganismenstämmen öfters Eigenschaften, welche sie kurz nach der Isolierung aus der Natur besaßen, beim Kultivieren im Laboratorium geschwächt. oder sie gehen gänzlich verloren. Bei unserem Ausgangsstamm zeigt sich diese Abschwächung nicht nur hinsichtlich der Saccharose: die Gärung von Dextrose und Lävulose, welche am 4.—5. Tage beginnt, endet, selbst bei Brutschranktemperatur, erst nach 10—12 Tagen, und bei Zimmertemperatur kann sie zuweilen 1½—2½ Mon. dauern, wobei sich jeden Tag nur einige CO_2-Bläschen bilden. Eine analoge Erscheinung beobachtete Schiöning (1908) bei Vergärung von Würze durch eine torulaähnliche Hefe — Brettanomyces Hjelte: die Gärung dauerte bei 20° C — 8 Mon. Eine Verkürzung des Gärungstermins wird in unserem Falle schon bei den Rassen C_{II} und D beobachtet; Rasse E_I unterscheidet sich wesentlich von der Ausgangsrasse A: die Gärung beginnt während der ersten 2 Tage und dauert 4—5 Tage (im Brutschrank) und 10—14 Tage (bei Zimmertemperatur). Die Saccharose wird durch die Rasse E_I intensiv und ziemlich schnell vergoren. Somit finden wir bei der unter dem Einfluß der Radiumwirkung entstandenen Rasse E_I eine Wiederherstellung der Fähigkeit, Saccharose zu vergären, welche die Ausgangsrasse bei der Fortzüchtung im Laboratorium verloren hat.

Tab. 2. Die Vergärung von Kohlenhydraten durch die Rassen des Zygosaccharomyces mandshuricus.

	Dextrose	Galaktose	Saccharose	Maltose	Laktose	Dextrin
A	1,5	—	—	—	—	
B	1,7	—	—	-	-	
C_I	1,4	-				
C_{II}	1,7	-	-		-	
D	1,4	—				
E_I	1,5	1,4	1,1	1,0		
G_I	1,5	1,2	1,4	1,0		-
G_{II}	1,5	1,5	1,2	0,9		-
G_{III}	1,7	1,5	1,6	1,3		-
F	1,5	1,2	1,3	1,4		-
I_I	1,7	1,7	1,7	1,4	-	—
I_{II}	2,1	1,5	1,5	1,6	—	—
M	1,4	1,6	1,9	1,4	—	—
L	1,5	1,7	2,0	0,9	—	—
H	1,8	1,6	2,2	1,6	—	—
O	1,7	1,6	2,0	1,2	—	—
P	1,5	1,5	1,8	1,6	—	—

Die Zahlen bezeichnen die Menge des in der Flüssigkeit (Hansens Nährboden + 5% der Kohlenhydrate) nach der Gärung erhaltenen Alkohols in % (Durchschnittszahlen aus 3 Versuchen). Die Untersuchungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt.

Die Rasse E_I und alle aus ihr entstandenen Rassen unterscheiden sich von der Rasse A und B aber nicht nur durch die Dauer und die Intensität der Vergärung von Dextrose, Lävulose und Saccharose. Bei der Aussaat der Rasse E_I auf flüssige Würze wird, im Gegensatz zur Rasse A, auch eine erhöhte Gasbildung beobachtet. In der angewandten Bierwürze ist hauptsächlich Maltose vorhanden. Die Aussaat der Rasse E_I in Hansens Lösung mit Maltose zeigt, daß sie tatsächlich eine Gärung der Maltose hervorruft. Durch weitere Versuche wurde festgestellt, daß die Rasse E_I und alle von ihr stammenden Rassen (darunter auch die glatte Rasse G_I) außer Dextrose Lävulose und Saccharose auch Galaktose und Maltose vergären, und sich dadurch wesentlich von der Ausgangsrasse und den ihr genetisch nahestehenden glatten Rassen B—D unterscheiden[1]). Laktose und Dextrin werden durch keine dieser Rassen vergoren (Tab. 2).

Die qualitativen Veränderungen der fermentativen Eigentümlichkeiten unserer Rassen verdienen besonders berücksichtigt zu werden. Einer Reihe von Autoren gelang es, die fermentativen Eigenschaften der Hefen zu verändern; dieses jedoch nur hinsichtlich der Galaktose: die Hefen, die unter normalen Bedingungen Galaktose nicht vergären, gewöhnten sich allmählich an dieselbe. Solch ein allmähliches Anpassen, für welches noch keine befriedigende Erklärung gefunden ist[2]), kann jedoch nicht, wenigstens nicht zur Zeit, in eine Reihe mit den erblichen Veränderungen der Gärungseigentümlichkeiten des Pilzes Zygosaccharomyces mandshuricus unter dem Einfluß der Radiumemanation gestellt werden[3]). Alle Rassen, die aus der Rasse E_I entstanden sind, und ebenso diese letztere selbst, vergären Würze; der Charakter der Gärung ist jedoch nicht der gleiche. Bei den Rassen G_{III} und L bleibt die Würze während der Gärung ganz klar und durchsichtig; bei der Rasse E_I und den aus ihr stammenden Rassen trübt sich die Würze während der Gärung stark. Der Charakter des Wachstums auf flüssiger Würze ist auch verschieden. Bei der Rasse G_{III} und L ist der Hefebodensatz gering und kompakt, ebenso wie bei den Rassen, welche die Würze schwach vergären (Rassen A—D); alle übrigen Rassen bilden einen großen und lockeren Bodensatz. Der Unterschied in der Bodensatzmenge der Kulturen in flüssiger Würze kann wesentlich sein. Wahrscheinlich läßt sich dieses in einigen Fällen dadurch erklären, daß in unserer Würze von Kohlenhydraten fast ausschließlich Maltose vorhanden ist. So bildet z. B. die Rasse E_I, welche Maltose vergärt, in der Würze einen Hefebodensatz, der mehr als 3mal größer ist, als derjenige der Ausgangsrasse A, welche Maltose nicht vergärt. In diesem Falle gehen wohl die Verwendung des Zuckers zur Nahrung und zur Vergärung parallel (Tab. 3). Daß dieser Parallelismus nicht als Regel gelten kann, ist aus den Arbeiten von Euler und Palm (1913) und anderen Autoren ersichtlich. Solch ein Parallelismus fehlt auch bei Gegenüberstellung entsprechender Ergebnisse aus den Arbeiten von Nadson und Rochlina (1933). Diese Erklärung gilt in unserer Arbeit nur für die Rassen A—D, welche die Maltose nicht vergären, jedoch nicht für die Ras-

[1]) Es sei darauf hingewiesen, daß die Existenz eines besonderen Fermentes — Galaktozymase — strittig ist (siehe Harden 1932). Willstatter (1922) zeigte, daß die Vergärung der Maltose in einigen Fallen direkt vor sich gehen kann, ohne vorhergehende Wirkung der Maltase.

[2]) Eine Zusammenfassung der Ergebnisse ist in den Arbeiten von Euler und Lindner (1915) und Harden (1932) zu finden.

[3]) Wir fuhren augenblicklich eine Reihe von Versuchen durch, um die sog. „Anpassung" der Hefe zur Vergarung der Galaktose zu studieren.

sen G_{III} und L. Außerdem bildet sich bei den Rassen G_{III} und L. im Gegensatz zu allen übrigen, kein Hefering auf der Oberfläche der Würze, sogar während des zweiten Monats der Entwicklung nicht.

Unmittelbare quantitative Prozentbestimmungen des in den vergorenen Lösungen enthaltenen Alkohols wurden für alle unsere Rassen durchgeführt und in einigen Versuchen nach der Menge der ausgeschiedenen Kohlensäure (CO_2) kontrolliert (Tab. 2). Alle unmittelbar von der Rasse E_I stammenden Rassen vergären Saccharose intensiver, als ihre gemeinsame Stammrasse (siehe Abb. 1); bei der Rasse H ist die Menge des sich bildenden Alkohols zweimal größer, als bei der Rasse E_I, doch vergären die aus der Rasse H entstandenen Rassen O und P Saccharose etwas schwächer, als die Rasse H. Dextrose wird von den meisten übrigen Rassen besser vergoren, als von der Ausgangsrasse A. Die meisten aus der Rasse E_I entstandenen Rassen vergären Galaktose und Maltose besser als letztere. Überhaupt können die fermentativen Eigenschaften der neuen Rassen sowohl in der Richtung der Erhöhung der Gärungsintensität, als auch der Verminderung derselben vor sich gehen. (Ersteres wurde von Nadson und Rochlina bei einer von ihnen erhaltenen Radiumrasse von Saccharomyces cerevisiae beobachtet.)

Tab. 3. Das Gewicht des Hefebodensatzes (in g) der Rassen von Zygosaccharomyces mandshuricus 20 Tage nach der Beimpfung.

	In 400 ccm Wurze		In 3,7 l Wurze	
	Rasse A	Rasse E_I	Rasse A	Rasse E_I
der mit Filtrierpapier getrockneten Hefemasse	0,337	1,414	4,390	21,390
der Trockensubstanz (die Hefenmasse ist bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden)	0,331	0,894	4,320	13,970

Nach der Menge des gebildeten Alkohols kann man natürlich nicht über den Charakter der während der Gärung vor sich gehenden Reaktionen urteilen. So z. B. bilden die Ausgangsrasse A und die Rasse E_I bei der Vergärung von Hansens Lösung mit Dextrose eine gleiche Menge Alkohol —1½%; die Zuckermenge (Restzucker), die in der Flüssigkeit nach beendeter Gärung verbleibt, ist auch dieselbe. Dennoch verläuft die Dextrosegärung bei den beiden Rassen verschieden. Der Unterschied besteht in der verschiedenen Dauer des Gärungsprozesses und hauptsächlich in den großen Abweichungen des p_H und der allgemeinen Azidität der vergorenen Flüssigkeiten. So betrug z. B. in einem der Versuche der p_H der vergorenen Hansenschen Lösung mit Dextrose 4,0 bei der Ausgangsrasse A, und 5,4 bei der Rasse E_I. Dementsprechend brauchte man zum Neutralisieren der in 3 ccm der vergorenen Flüssigkeit enthaltenen Säure 2,6 ccm n/10 NaOH in dem ersten Falle, und 1,2 ccm im zweiten Falle. Somit hängt wohl die längere Dauer der Gärung bei der Ausgangsrasse von der erhöhten Säurebildung ab. Bei Erhöhung der Zuckerkonzentration wächst dieser Unterschied. Zygosaccharomyces mandshuricus kann, nach Angaben von Saito, sehr hohe Glukosekonzentrationen vertragen (bis 80%). Analoge Beobachtungen an anderen Arten von Zygosaccharomyces sind in der Arbeit von Sacchetti (1932) angeführt. Nach Beobachtungen von Satava (1930) vergären einige Zygosaccharomycesarten eine 66 proz.

Saccharoselösung. Angaben über die Widerstandsfähigkeit verschiedener Arten von Zygosaccharomyces hohen Zuckerkonzentrationen gegenüber sind ausführlich in den Arbeiten von Kroemer und Krumbholz (1931) angeführt. Diese Angaben zeigen, daß viele Zygosaccharomycesarten osmophyl sind. Unsere Ausgangsrasse Zygosaccharomyces mandshuricus ruft in einer 50 proz. Dextroselösung bei 22° C eine Gärung nur am 5. Tage hervor, wobei im Laufe einer 10 tägigen Gärung sich im geschlossenen Schenkel des Dunbar-Röhrchens nur 1,5 ccm CO_2 ansammelt, während bei der Rasse E_I unter gleichen Bedingungen die Gärung am zweiten Tage beginnt, und das sich ansammelnde Gas einige Male am Tag die Flüssigkeit aus dem geschlossenen Schenkel des Röhrchens hinausdrängt. Rasse E_I ist, im Gegensatz zur Ausgangsrasse, osmophyl.

Serologische Eigenschaften. Die präzipitierenden Eigenschaften der Seren nach der Immunisierung von Kaninchen mit der Ausgangsrasse Zygosaccharomyces mandshuricus wurden hinsichtlich aller unserer Rassen untersucht. Außerdem wurden zur Herstellung von Antigenen für die Reaktionen noch eine andere Art derselben Gattung (Zygosaccharomyces Barkeri), eine Art einer nahestehenden Gattung (Saccharomyces cerevisiae) und eine Art einer entfernteren Gattung (Debaryomyces tyrocola) verwendet. Als Kriterium diente die Ringbildung an der Berührungsgrenze des Serums mit dem Antigen. Die Rassen B, C_I und C_{II} stehen serologisch der Ausgangsrasse A am nächsten, denn wie es sich erwiesen hat, unterscheiden sie sich von derselben nur wenig. Etwas größer ist dieser Unterschied bei der Rasse D. Die Rasse E_I und alle von ihr stammenden Rassen, die glatte Rasse G_I mit einbegriffen, unterscheiden sich außerordentlich stark von der Ausgangsrasse A und geben einen schwachen Ring nur bei der ersten Verdünnung[1]).

Zygosaccharomyces Barkeri — eine Art derselben Gattung, zu der auch unser Ausgangsstamm gehört — gibt eine positive Reaktion bei allen Verdünnungen. Die zu anderen Gattungen gehörenden Saccharomyces cerevisiae und Debaryomyces tyrocola geben, gleich der Rasse E_1, einen schwachen Ring nur bei der ersten Verdünnung[2]). Somit deutet sich hier ein Maßstab einer taxonomischen Qualifikation unserer Rassen an: einige von ihnen unterscheiden sich von der Ausgangsrasse nicht weniger stark als die Arten anderer Gattungen.

Die Beurteilung der Resultate.

Ein großer Prozentsatz der durch die Wirkung der Röntgenstrahlen oder des Radiums hervorgerufenen erblichen Veränderungen sind letal; was aus zahlreichen Arbeiten mit pflanzlichen, als auch mit tierischen Objekten bekannt ist. Wir hatten oftmals Gelegenheit, in der sog. „sterilen" Zone, die unmittelbar an der Kapillare liegt, Kolonien zu beobachten, deren Wachstum fast vollständig gehemmt worden ist, und die nur mit Hilfe eines Mikroskopes wahrgenommen werden können. Nach dem Entfernen der Kapillare hört das Wachstum dennoch bald ganz auf. Die Kolonien bestehen, der Form nach, aus sehr verschiedenartigen, hyper-

[1]) Damit wird noch einmal das Unzulängliche der Klassifizierung von Mikrobenvarianten nach der S- und R-Form hervorgehoben.

[2]) Eine Zusammenfassung der Literaturangaben über die Serologie der Hefen und auch die Beschreibung der von uns angewandten Methodik siehe in unserer anderen Arbeit. (Olenov, Botan. Archiv. 1935. Im Druck.)

trophischen, oft mißgestalteten Zellen. Die Überimpfung aus solchen Kolonien gelingt nicht, die in den Zellen vorangegangenen Veränderungen sind wahrscheinlich letal (Abb. 5). In einem Falle erhielten wir beim Bestrahlen der Rasse D neben der Rasse E_I zugleich die Rasse E_{II}, welche sich als letal erwies. In der Plattenkultur entwickelten sich 41 Kolonien der Rasse D und 8 dunkelgelbe, glänzende Kolonien der Rasse E_{II}. Die Untersuchung zeigte, daß die überwältigende Mehrzahl der Zellen dieser Kolonien sehr viel Fett enthielt. Bei einer Plattenkultur der dunkelgelben Kolonien erhielten wir nur eine geringe Zahl Kolonien der Rasse D (nicht letalen). Trotz aller Bemühungen gelang es uns nicht, die letale Rasse E_{II} bei den Überimpfungen zu erhalten.

Es wird oft darauf hingewiesen, daß die erblichen Veränderungen, die unter dem Einfluß der Strahlenenergie entstehen, nicht progressiv sind (Plusveränderungen). Unser Material kann nicht zur Bestätigung dieses Standpunktes dienen. Die erste faltige Rasse E_I und alle aus ihr entstandenen Rassen vergären außer den Zuckerarten, die von der Ausgangsrasse vergärt werden, auch Galaktose und Maltose[1]). Unter vollkommener Ausnutzung des sich in der Würze befindenden Zuckers vermehren sich diese Rassen viel schneller, als die Ausgangsrasse und die Rassen B—D. Es ist wesentlich, daß dieser Unterschied im Vermehrungstempo auch in den aus verschiedenen Rassen bestehenden Mischkulturen erhalten bleibt. In der Plattenkultur aus der Kolonie, aus welcher die Rasse E_I entstanden war, entwickelten sich 50% Kolonien der Rasse D, welche bestrahlt worden war, und 50% Kolonien einer neuen Rasse E_I, die, im Gegensatz zu den Rassen A—D, Galaktose und Maltose vergärt. Wenn man jedoch Würze mit demselben gemischten Material besät und nach 20 Tagen daraus Plattenkulturen anlegt, so vergrößert sich der Prozentsatz der Kolonien der Rasse E_I bis 78—81% (die Versuche wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt). Die Ursache dieser Verschiebung liegt in den obenerwähnten Veränderungen der Gärungseigentümlichkeiten, die den neuen Rassen große Vorzüge verleihen.

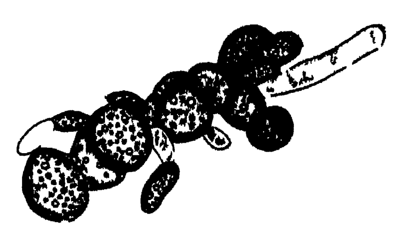


Abb. 5. Eine „Kolonie", welche sich in einer Entfernung von 2 mm von der Kapillare entwickelt hat und bei der Bestrahlung der Rasse E_I entstanden ist. (Die Dosis betrug 4,73 m. c. d. Vergrößerung 500×.)

Das Entstehen neuer Rassen bei *Zygosaccharomyces mandshuricus* wird nicht zum ersten Male beschrieben. Saito, der

[1]) Die nachstehenden Arten der Gattung *Zygosaccharomyces* unterscheiden sich voneinander öfters durch ihre fermentativen Eigenschaften (siehe z. B. die Arbeit von Sacchetti 1932 und die Zusammenfassung der Ergebnisse von Stelling-Dekker 1931); wir haben jedoch nicht genügend Veranlassung, im vorliegenden Falle die bei einigen von unseren Rassen stattgefundenen Veränderungen als Beispiel von Atavismus anzusehen. Kürzlich ist in einer Arbeit von Nadson und Krassilnikow (1932) das „spontane" Entstehen einer hefeähnlichen Rasse beim Endomycet *Guillermondella selenospora* beschrieben worden. Diese Rasse vergärt, im Gegensatz zur Ausgangsrasse, Mannose, Glukose und Fruktose. Über eine ähnliche spontane Veränderung der fermentativen Eigenschaften bei einer Torulaart berichtet Lindner (1930). An unseren Rassen haben wir ein Beispiel solcher Plusveränderungen, die jedoch nicht spontan, sondern unter dem Einfluß der Bestrahlung entstanden sind.

diese Art isoliert und studiert hat. beobachtete die „spontane“ Bildung einer neuen. asporogenen Rasse.

Die Unterscheidungsmerkmale dieser Rasse sind folgende: Sie ist beständig asporogen, die Oberfläche der Kolonien ist kraus; die meisten Zellen sind länglich-oval, ellipsoid gestreckt, mit scharf konturierten Vakuolen und einem geringen Gehalt an Glykogen. Der sich in der Würze bildende Bodensatz ist flockig und besteht aus zusammenhängenden Zellketten. (Über die fermentativen Eigenschaften seiner Rasse führt Saito keine Ergebnisse an.)

Beim Vergleich der Beschreibung von Saito mit der Charakteristik unserer Rasse E_I überzeugten wir uns davon, daß allen aufgezählten Merkmalen nach die Rasse E_1 und die von Saito studierte asporogene Rasse identisch sind. Letzteres gibt uns die Möglichkeit zu vermuten. daß der Prozeß der Veränderung in den beiden Fällen auf ähnliche Weise verlief, und daß die unter dem Einfluß der Radiumeinwirkung entstandenen erblichen Veränderungen hier sowohl, wie bei vielen anderen Objekten, den „spontan“ entstandenen erblichen Veränderungen analog sind. Ein vorzügliches Beispiel dafür finden wir in der Arbeit von Philippov. der aus Torulopsis mit Hilfe von Röntgenbestrahlung Rassen erhielt, die ihren wichtigsten Merkmalen nach den von ihm aus der Natur isolierten Rassen ähnlich sind.

Tab. 4. Merkmale der Rassen von Zygosaccharomyces mandshuricus, welche sich unabhängig voneinander verändern können.

Die theoretisch möglichen Kombinationen der Merkmale	Die Rassen, welche diesen Kombinationen entsprechen	Die theoretisch möglichen Kombinationen der Merkmale	Die Rassen, welche diesen Kombinationen entsprechen
a b c d	A, B, C_I	a_1 b c_1 d	—
a b c d_1	—	a_1 b_1 c d	—
a b c_1 d	—	a b_1 c_1 d	—
a b_1 c d	C_{II}, D	a_1 b_1 c_1 d	—
a_1 b c d	—	a_1 b^1 c d_1	G_{III}, L
a b c_1 d_1	—	a_1 b c_1 d_1	—
a b_1 c d_1	—	a b_1 c_1 d_1	G_I
a_1 b c d_1	—	a_1 b_1 c_1 d_1	E_1, F, G_{II}, H, I_I, I_{II}, M, O, P

Die Form der Kolonien.
a = glatte
a_1 = faltige
Sporenbildung.
b = sporogene
b_1 = asporogene

Zellverbände.
c = einzelne Zellen
c_1 = Zellketten
Fermentative Eigenschaften.
d — d. Fehlen der Fähigkeit Galaktose und Maltose zu vergären
d_1 — d. Vorhandensein dieser Fähigkeit

Solange die Natur der erblichen Veränderungen, die bei unserem Objekt (und auch bei anderen, ihm nahestehenden, einzelligen Organismen) unter der Wirkung der Strahlenenergie entstehen, unaufgeklärt bleibt, dürfen diese Veränderungen, nach dem Vorschlag von Nadson (1932), nicht als Mutation, sondern müssen als Saltation gekennzeichnet werden, indem man unter diesem Begriff eine Erscheinung versteht, die der Mutation bei höheren Organismen analog ist[1]). Das Studium des Rassebildungsprozesses

[1]) Siehe hierüber die Arbeiten von Rippel (1929), Lasseur, Marshal und Dupaix (1933) und Dupaix (1933). Eine Zusammenfassung älterer Versuchsergebnisse über die Variabilität der Hefen findet man im Buche von Guilliermond (1920).

erlaubt jedoch einige Richtlinien aufzustellen [vgl. die Resultate der Arbeiten von Dickson (1932) und Punkari und Henrici (1933)]. Wenn man also 4 Merkmale nimmt: 1. Die Form der Kolonien (glatt-faltig), 2. die Sporenbildung (Sporenbildung — das Fehlen der Sporenbildung), 3. Zellverbände (isolierte Zellen — Zellketten) und 4. fermentative Eigentümlichkeiten (die Fähigkeit, Galaktose und Maltose zu vergären — das Fehlen dieser Fähigkeit), so erweist es sich, daß alle 4 Merkmale unabhängig voneinander sich verändern können (siehe Tab. 4). Tatsächlich geht die Veränderung des ersten Merkmals bei Bildung der Rasse G_{I} völlig unabhängig von den 3 übrigen vor sich; das zweite Merkmal verändert sich bei der Entstehung der Rasse C_{II}, wobei die übrigen Merkmale beständig bleiben; und endlich verändert sich das dritte Merkmal wiederum unabhängig von den übrigen 3 bei der Bildung der Rassen G_{III} und L. Ungeachtet dessen, daß aus 16 theoretisch möglichen Kombinationen dieser Merkmale wir nur 5 erhalten haben, ist es genügend, um zu erkennen, daß alle 4 Merkmale von verschiedenen Genen abhängen, und um somit zum Studium des Genotypus des Organismus überzugehen. Anderseits besitzen die Rassen G_{III} und L einen ganzen Komplex von Eigenschaften, die scheinbar eng miteinander verbunden und bei keiner anderen Rasse vorzufinden sind: 1. Beim Vergären von Würze rufen diese Rassen (G_{III} und L) keine Trübung hervor. 2. Auf der Oberfläche der Würze bildet sich kein Hefering, sogar nach Verlauf mehrerer Monate nicht. 3. Die Kolonien der Rassen G_{III} und L (auf Würze-Agar) altern viel rascher, als die Kolonien der übrigen Rassen. Bei der Darstellung von Einzell-Kulturen wurde häufig beobachtet, daß in 20 tägigen Kulturen der Rassen G_{III} und L die Anzahl der vermehrungsfähigen Zellen geringer war, als bei den übrigen Rassen. Die Zellmembran der meisten Zellen in 20 tägigen Kulturen auf Würzeagar ist schwer zu unterscheiden, deutlich sieht man nur kleine Fettropfen („Schattenzellen"). Außerdem bilden nur diese beiden Rassen aus einer ganzen Anzahl von Rassen, welche Maltose vergären, in der Würze einen charakteristischen geringen kompakten Bodensatz. Zur Ergründung der Frage, wie eng alle diese Merkmale miteinander verbunden sind, kann das Studium der Eigentümlichkeiten der, als Sektormutant aus einer Riesenkolonie der Rasse L entstandenen, Rasse Q sich als sehr wesentlich erweisen.

Im Zusammenhang damit ist noch zu erwähnen, daß die neu entstandenen Rassen sich nur selten durch ein einziges Merkmal von der Stammform unterscheiden. In der überwiegenden Mehrzahl der Fälle verändert sich gleichzeitig eine ganze Reihe von Eigenschaften. Im Grunde genommen tritt nur an unserem Objekt die auch bei den höheren vielzelligen Organismen gut bekannte Erscheinung besonders deutlich zutage: jede Veränderung der erblichen Struktur beeinflußt gewöhnlich eine ganze Reihe von Merkmalen. Zuletzt verdient die Tiefe und Mannigfaltigkeit der Veränderungen, die bei unserem Objekt durch Einwirkenlassen der Radiumemanation hervorgerufen worden sind, besonders erwähnt zu werden. Die Form und die Größe der Zellen, das Vorhandensein der Sporenbildung und ihre Eigentümlichkeiten, die fermentativen Eigenschaften, die Widerstandsfähigkeit hohen Temperaturen gegenüber, antigene Eigenschaften und eine Reihe anderer Merkmale verändern sich unter dem Einfluß der Radiumwirkung. Die Veränderung berührt alle wichtigsten Merkmale, auf Grund derer die Bestimmung der Art geschieht.

Schlußfolgerungen.

Auf Grund der angeführten Ergebnisse halten wir es für möglich, folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Zur Erzielung erblicher Veränderungen der Kolonieformen der Hefe Zygosaccharomyces mandshuricus mußte eine viermalige Bestrahlung durchgeführt werden. Beim Summieren der angewandten Dosen erhalten wir die Zahl 18,73 m. c. d., d. h. eine Dosis, die bei einmaliger Bestrahlung letal ist. Es scheint möglich, daß auf diese Weise auch bei anderen Organismen, bei denen durch Einwirkenlassen der Strahlenenergie schwer neue Rassen erhalten werden, wesentliche erbliche Veränderungen zu erzielen wären.

2. Ein bedeutender Teil der durch die Wirkung der Bestrahlung entstandenen erblichen Veränderungen (Saltationen) beeinflussen die Form der Kolonien nicht. Daher ist es notwendig, zur vollkommenen Kontrolle der stattfindenden Veränderungen eine mikroskopische Untersuchung nicht nur derjenigen Kolonien, die sich ihrer Form nach von der Ausgangsform unterscheiden, sondern aller bestrahlten Kolonien durchzuführen.

3. Die Veränderungen betreffen alle wichtigsten Merkmale, die zur Bestimmung der Art dienen: die Form und Größe der Kolonien, die Form und die Größe der Zellen, die Sporenbildung und ihre Eigentümlichkeiten, die fermentativen Eigenschaften, die Widerstandsfähigkeit hohen Temperaturen gegenüber, antigene Eigenschaften u. a. Bei wiederholten Bestrahlungen gelingt es nicht bei der genannten Hefe, irgendeine bestimmte Reihenfolge oder Regelmäßigkeit im Auftreten der verschiedenen Veränderungen wahrzunehmen. Die Veränderungen können bei ihr in direkt entgegengesetzten Richtungen verlaufen.

4. Die sog. „spontane“ Bildung neuer erblicher Eigenschaften, welche wir bei dem Ausgangsstamm niemals beobachteten, haben wir bei den neuen, unter dem Einfluß der Bestrahlung entstandenen Rassen dreimal konstatiert: möglicherweise, weil letztere labiler als die Ausgangsrasse sind.

5. Unter dem Einfluß der Bestrahlung können erbliche Veränderungen der fermentativen Eigenschaften des Organismus stattfinden. Einige von unseren neuen Rassen vergären außer den Zuckerarten, die auch von der Ausgangsrasse vergärt werden, auch solche, die von derselben nicht angegriffen werden, nämlich Galaktose und Maltose. Neue fermentative Eigenschaften dieser Rassen verleihen ihnen große Vorzüge, dank welcher sie sich rascher vermehren (sogar in Mischkulturen, die aus zwei Rassen bestehen), als die der Ausgangsform nahestehenden Rassen.

6. Bei den neuen Rassen sind nicht nur diese oder jene morphologisch-physiologischen Eigenschaften, sondern auch die sich in der Präzipitationsreaktion äußernden spezifischen Eigenschaften des Eiweißes verändert. Serologisch unterscheiden sich einige neue Rassen von dem Ausgangsstamm des Zygosaccharomyces mandshuricus viel wesentlicher, als eine andere Art derselben Gattung (Zygosaccharomyces Barkeri) und nicht weniger als einige Arten anderer Gattungen (Saccharomyces cerevisiae und Debaryomyces tyrocola).

7. Die Untersuchung des Rassenbildungsprozesses gestattete es, das Studium der erblichen Struktur solcher Organismen aufzunehmen, bei denen die gewöhnliche Untersuchungsmethode — die Kreuzung — unanwendbar ist. Es ist uns gelungen, Merkmale ausfindig zu machen, die sich unab-

hängig voneinander verändern, und anderseits solche, die miteinander verbunden sind, d. h. sich gemeinsam verändern.

Zum Schluß erachte ich es als meine Pflicht, Herrn Prof. Dr. G. A. Nadson meinen innigsten Dank für die Leitung dieser Arbeit darzubringen.

Literatur.

1. Dickson, Ann. of Bot. Vol. 46. 1932. No. 182. — 2. Dupaix, B. Caryocyaneus Beijerinck-Dupaix 1930. 1933. — 3. Euler und Lindler, Chemie der Hefe u. der alkohol. Gärung. 1915. — 4. Euler und Palm, Biochem. Ztschr. Bd. 60. 1913. — 5. Guilliermond, The Jeasts. 1930. — 6. Harden, Alcoholic fermentation. 1932. — 7. Kroemer und Krumbholz, Arch. f. Mikrobiol. Bd. 2. 1931. — 8. Lasseur, Marshal et Dupaix, Trav. Lab. Mikrob. Nancy. Fasc. 3. 1930. — 9. Lindner, Mikroskopische u. biol. Betriebskontrolle in d. Gärungsgewerben. 1930. — 10. Nadson, Das Problem der Variabilitat der Mikroben. 1931. — 11. Nadson et Krassilnikov, C. R. Acad. Sci. de l'USSR. 1932. — 12. Nadson et Philippov, C. R. Soc. Biol. T. 93. 1925: C. R. Acad. Sci. Paris. T. 186. 1928; Ann. de Röntgenologie et Radiologie, Leningrad. T. 10. 1932. — 13. Nadson et Rochlina, Arch. f. Mikrob. Bd. 4. 1933. — 14. Philippov, Ann. de Röntgenologie et Radiologie, Leningrad. T. 10. 1932. — 15. Punkari and Henrici, Journ. of Bacter. Vol. 26. No. 1. 1933. — 16. Rippel, Med. klin. Wochenschr. Nr. 24. 1929. — 17. Sacchetti, Att. d. R. Acad. Naz. de Lincei. Rendiconti. T. 15. F. 9. 1932; Arch. f. Mikrobiol. Bd. 4. H. 3. 1932. — 18. Saito, Rep. cent. lab. South. Manshuria Railway Co. 1914; Journ. Coll. Sci. Imp. Univ. Tokyo. T. 39. Art. 3. 1916. — 19. Satava, Ztschr. f. Zuckerind. Tschechoslowak. Rep. B. 44. 1920. — 20. Schiöning, C. R. Trav. Lab. de Carlsberg. T. 7. 1908. — 21. Stelling-Dekker, Die sporogenen Hefen. (Verh. d. K. Akad. van Wetenschappen te Amsterdam. Afd. Naturkuunde. 2. Ser. Deel 28.) — 22. Willstatter, Ztschr. f. physiol. Chemie. Bd. 150. 1922.

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über die sog. Gutartige Faulbrut der Honigbiene.

[Aus der Biologischen Reichsanstalt für Land- und Forstwirtschaft; Dienststelle zur Erforschung und Bekämpfung der Bienenkrankheiten.]

Von **A. Borchert.**

Als eine zur Zeit noch umstrittene Frage ist es anzusehen, ob die Gutartige Faulbrut eine einheitliche, durch einen ganz bestimmten Mikroorganismus ausgelöste Krankheit der Bienenbrut ist, oder ob wir es hierbei mit einer Gruppe von mehreren einander ähnelnden Krankheiten zu tun haben. Nach der einen Meinung wird das Krankheitsbild nicht durch den Erreger selbst bestimmt, sondern durch eine Reihe von Begleitbakterien, die mit verhältnismäßig großer Regelmäßigkeit anzutreffen sind. Nach der anderen Ansicht sind die Erreger der einzelnen Krankheiten z. T. unter jenen „Begleitbakterien" zu suchen, z. T. sind es noch nicht näher bestimmte Bakterienarten, die aber wiederholt und in den einzelnen Fällen meistens sehr zahlreich in der toten Brut gefunden werden können. Diese Ansicht steht in einer gewissen Beziehung zu mehreren, besonders in der ausländischen Literatur der letzten Jahre sich vorfindenden Angaben, die entweder von Mischinfektionen bei der Gutartigen Faulbrut sprechen oder das Vorkommen verschiedenartiger Keime mit einem Pleomorphismus des vermeintlichen Erregers erklären wollen.

Ein kurzer Überblick über die einschlägige Literatur läßt erkennen, welche Unklarheiten auf dem Gebiete der Erforschung der Gutartigen Faulbrut bestehen. Cheshire und Cheyne sahen im Jahre 1885 den Bac. alvei zwar als den Erreger der Gutartigen Faulbrut an, aber im Hinblick auf die stets — im übrigen bis zum heutigen Tage — mißlungenen Infektionsversuche mit diesem Bazillus beschäftigte man sich weiter (Howard, Harrison, Bahr, Burri, Maaßen) mit der Frage der Erregerschaft. Hierbei darf jedoch nicht übersehen werden, daß die Klärung der bakteriologischen Befunde dadurch erschwert wurde, daß die Ätiologie der durch Bac. larvae hervorgerufenen Bösartigen Faulbrut damals noch nicht bekannt war und daß sich so das Bild dieser Krankheit mit dem der Gutartigen Faulbrut vermischte. In der Folgezeit erklärte dann White als Erreger der Gutartigen Faulbrut den in seiner Form variablen Bac. pluton, der im Verlaufe der Krankheit zurückgedrängt wird, und bei den anderen mehr oder weniger regelmäßig bei dieser Krankheit zu beobachtenden Bakterienarten, wie Bac. alvei, Streptococcus apis, Bact. eurydice und Bac. orpheus, handele es sich um Begleitbakterien. Aber auch diese Theorie befriedigte noch nicht, zumal es nicht gelang, den vermeintlichen Erreger zu züchten und mit ihm einwandfreie Ansteckungsversuche vorzunehmen. Maaßen folgerte aus seinen Untersuchungen, „daß wir es bei der Faulbrut vielfach mit Bakterien-Assoziationen zu tun haben, d. h. mit Mischinfektionen und auch mit Sekundär-Infektionen". Sturtevant hat bei der Gutartigen Faulbrut — in Amerika Europäische Faulbrut genannt — ebenfalls Mischinfektionen beobachtet, und Morgenthaler sprach die Vermutung aus, daß sich unter dem Namen Gutartige Faulbrut zwei oder mehrere Krankheiten verbergen. Toumanoff berichtete ebenfalls über besondere bakteriologische Befunde in einem von ihm beobachteten, unter dem Bilde der Gutartigen Faulbrut verlaufenden Krankheitsfall. Ähnlich lauten die Angaben von Falkner, Morison u. a. m. Wharton teilte mit, daß es ihm gelungen sei, den Bac. pluton gezüchtet und mit ihm die Bienenbrut erfolgreich zum Erkranken gebracht zu haben. Nach Lochheads Angaben soll es sich allerdings um eine dem Streptococcus apis Maaßen nahestehende oder mit ihm identische Kultur gehandelt haben. Erwähnt seien die Ansichten von Lochhead über die pleomorphe Natur dieses Kokkus: er beurteilt den Bac. alvei lediglich als einen sekundär in die Brut gelangenden Mikroorganismus, der je nach den Aufzuchtbedingungen sporogen oder asporogen auftreten und auch kokkoide Formen annehmen kann, die für das Zustandekommen der Europäischen Faulbrut von besonderer Bedeutung seien. Mit diesem Kokkus von Lochhead vorgenommene Ansteckungsversuche führten jedoch nicht zu verwertbaren Ergebnissen. Der von Lochhead geäußerten Ansicht über einen Pleomorphismus des Bac. alvei schlossen sich dann Foster und Burnside an, als sie über eine neue, von ihnen beobachtete Brutkrankheit, die „Parafaulbrut", berichteten. In einer neuerdings erschienenen Arbeit kommt dann Burnside zu dem Schluß, daß mehrere gestaltlich verschiedene Bakterienformen mehr oder weniger regelmäßig und ausschließlich bei der Europäischen Faulbrut vorkommen, daß hinreichende Erklärungen über die Entstehung dieser Krankheit nicht gegeben werden können. In diesen ihren Betrachtungen über einen vermeintlichen Pleomorphismus des Bac. alvei — eine Frage, auf die hier absichtlich nicht eingegangen wird — glauben die genannten Verff. in den

von Löhnis und Smith und von Cunningham und Jenkins mitgeteilten Züchtungen kokkoider Formen aus Azotobakter bzw. Bac. amylobakter eine Stütze zu finden.

Die vorstehende Übersicht läßt durchaus die Vermutung zu, daß wir bei der sog. Gutartigen oder Europäischen Faulbrut eine Gruppe von ansteckenden Krankheiten annehmen können, die in ihren Erscheinungen sehr ähnlich sind. Offen jedoch sind noch die Fragen, ob und inwieweit die hierbei beobachteten Keime identisch sind und ob die in den einzelnen Krankheitsfällen nachgewiesenen Keime als Verursacher dieser Zustände zu gelten haben. Was den von White als Begleitbakterium angesehenen Bac. orpheus anbetrifft, so ist in neuester Zeit (1934) durch Ansteckungsversuche dargetan, daß dieser Bazillus in der Lage ist, die Bienenbrut zum Erkranken und zum Absterben zu bringen.

In der vorliegenden Arbeit wird der bisher beschrittene Weg weiter verfolgt, indem versucht wird, die Rolle dieser „Begleitbakterien" aufzudecken. Im folgenden wird berichtet über Untersuchungen und Ansteckungsversuche mit dem Streptococcus apis und mit drei bisher bei der Bienenbrut unbekannt gewesenen Bazillenarten.

A. Versuche mit Streptococcus apis.

Versuche, die Pathogenität des Streptococcus apis für die Bienenbrut nachzuweisen, sind mehrfach vorgenommen worden. Maaßen (1913) gelang es ebensowenig wie White (1920), die Pathogenität durch Verfütterung von Reinkulturen an Bienen zu beweisen. Lochhead hält seine Versuche, die Infektion durch Verfütterung von Kulturen des Kokkus an die Brut herbeigefuhrt zu haben, selbst nicht für entscheidend. Whartons Infektionsergebnisse mit einem Keim, den er für eine Reinkultur von Bac. pluton hielt, sind nicht überzeugend, wenngleich Lochhead, der die nicht autorisierte Arbeit Whartons einer Kritik unterzieht, den Stamm fur nahestehend, wenn nicht gar identisch mit Streptococcus apis Maaßen ansieht. Burnside gelang es nur in einem Fall, nach Infizierung von frisch aus kranken Maden gewonnenen Kulturen des Streptococcus apis das Bild der Europäischen Faulbrut zu erzeugen, wohingegen sämtliche übrigen Infektionsversuche mit Streptococcus apis und nichtsporenbildenden, den Bact. eurydice White ähnelnden Stäbchen ergebnislos ausfielen.

Die Angaben von Wharton, Lochhead und Burnside geben aber darüber keine Klarheit, ob es sich bei den von ihnen benutzten Infektionsstämmen tatsächlich um den echten Streptococcus apis Maaßen gehandelt hat oder um andere Kokken, von denen man verschiedene Arten in erkrankter Brut antreffen kann, die aber nach Maaßen den Gelatinenährboden nicht verflüssigen. Nicht nur eine genaue Beschreibung des Krankheitsbildes fehlt, das bei der Streptococcus apis-Infektion u. a. durch den säuerlichen Geruch gekennzeichnet ist, vermißt wird auch eine Angabe der biologischen und kulturellen Eigenschaften der Infektions- und der aus den infizierten Maden wiedergewonnenen Stämme. Solange diese Bedingungen nicht erfüllt sind, kann ein Urteil darüber nicht abgegeben werden, ob und inwieweit die Infektion als gelungen anzusehen ist. Die Beschreibungen sind hauptsächlich morphologischer Art, wobei aber noch besonders zu berücksichtigen ist, daß die Betrachtungen über den

vermeintlichen Pleomorphismus (s. o.) zur Klärung über die Identität der in Frage stehenden Stämme mit dem Streptococcus apis nicht beitragen.

Die bisher ungeklärte Frage der Pathogenität des Streptococcus apis für die Bienenbrut wurde versucht durch Ansteckungsversuche mit einem frisch aus erkrankter Brut gewonnenen Streptococcus apis-Stamm zu beantworten. Dieser stammte aus toter Brut einer der Biologischen Reichsanstalt Anfang Mai 1934 aus Pommern zu Auskunftszwecken übersandten Wabe. In 12 offenen Zellen lagen hell- und dunkelgelb verfärbte Madenreste von schmierig-breiiger Beschaffenheit und deutlich säuerlichem Geruch. Der Begleitbericht enthielt keine aufschlußreichen oder bemerkenswerten Angaben. In allen Maden konnten Kokken, z. T. zusammen mit Stäbchen verschiedener Arten färberisch nachgewiesen werden. Vier Stämme (8, 17, 42 und 43) sind aus den Brutresten gezüchtet worden, von denen der eine (Nr. 42) zu zwei Ansteckungsversuchen Verwendung fand.

Diese vier Stämme wiesen folgende Beschaffenheit auf: gestaltlich kennzeichnete sich im Tuschepräparat jeder als ein 1,0 μ langer und 0,9 μ breiter, deutlich zugespitzter Kokkus, der sich mit den gebräuchlichen Farbstoffen leicht färbte und die Gramfärbung nach dem üblichen Verfahren annahm, sich nach dem abgeänderten Verfahren von Kopeloff und Beermann (vgl. 3) jedoch + und — färbte.

Die auf schwach alkalischem Nähragar (Vitam-Bakt.; Vitam-Fabrik in Hameln) gewachsenen Kolonien sind im allgemeinen etwa 1 mm groß, nur selten etwas größer; grauweiß, scharfrandig, Randteil etwas heller als die Mitte, leicht abnehmbar, fast geruchlos und von schwachkörniger Struktur. Je kleiner die Kolonien sind, um so zarter sind sie und machen so einen tautropfenähnlichen Eindruck. — In Schrägröhrchen wird das Auspressungswasser stark getrübt. Gelatine wird in 1—2 Tagen verflüssigt.

Milch wird innerhalb 1—2 Tagen vollständig zum Gerinnen gebracht. Das zu Boden gesunkene Koagulum ist fest und pfropfartig und wird vom 12. Tage ab in geringem Maße peptonisiert. Die überstehende Flüssigkeit ist fast klar, grüngelb und wird, wie auch das Koagulum, durch Lackmuszusatz rot, durch Alizarol ockergelb gefärbt.

Wachstum in Peptonlösung (Witte-Pepton) bis zum 21. Tag keine Trübung, keine Haut; Bodensatz sehr mäßig und läßt sich durch Schütteln fädig aufwirbeln und völlig zerteilen. — Zusatz geringer Kalisalpetermenge verbessert die Wachstumsbedingungen nicht.

Auf der Kartoffel setzt gutes Wachstum innerhalb 24 Std. ein; der Belag ist aber nur schwach sichtbar, grauweiß, leicht abnehmbar, geruchlos, sehr schwach, nach 48 Std. aber etwas deutlicher glänzend.

In Lackmusmolke (Firma Fraenkel und Landau) gestalten sich die Wachstumsvorgänge wie in der Peptonlösung (s. o.); der Bodensatz ist feinstückig aufwirbelbar und löst sich völlig.

In eiweißfreier Lösung (K_2HPO_4 1,3 g, $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 2,5 g, $(NH_4)_2CO_3$ 3,5 g, Glyzerin 15,0 g, Aqua dest. 1000,0 g) bis zum 21. Tag keine Trübung, keine Haut, kein Bodensatz, keine Änderung der Reaktion.

Indol und Schwefelwasserstoff sind nicht gebildet und Nitrat ist nicht in Nitrit übergeführt, wohl aber sind Natrium selenosum und tellurosum reduziert worden. Mehrwertige Alkohole und Kohlehydrate werden unter starker Säurebildung

zersetzt: Mannit, Glyzerin, Trauben-, Rohr-, Frucht-, Milch-, Malzzucker, Raffinose (nur schwach!), Galaktose und Dextrin.

Die aufgeführten Eigenschaften der 4 Stämme 8, 17, 42 und 43 decken sich somit, soweit gleichartige Untersuchungen vorliegen, mit der von Maaßen gegebenen Beschreibung des von ihm gezuchteten Streptococcus apis, so daß ein Zweifel über die Identität der Stämme 8, 17, 42 und 43 mit Streptococcus apis nicht bestand.

Zur Ansteckung dienten rein wäßrige Abschwemmungen (100,0 ccm) von drei 18 Std. alten Röhrchen- und vier 36 Std. alten Schalenkulturen von Stamm 42. In Versuch 1 ist die eine Hälfte der Abschwemmung auf junge und alte Rundmaden auf allen vier Flächen zweier Halbwaben vorsichtig geträufelt worden, um so in Anpassung an die natürlichen Verhältnisse eine Erkrankung der Brut auf dem Fütterungswege unmittelbar herbeizuführen. Im Versuch 2 ist die andere Hälfte der Aufschwemmung in die leeren Zellen zweier Halbwaben übertragen und 2 Tage zum Trocknen aufgestellt worden, und die Waben sind alsdann einem anderen gesunden Bienenvolk der Anstalt eingehängt worden.

Versuch 1 (1. Juni 1934).

Wo im folgenden nichts besonderes erwähnt, beziehen sich die Befunde auf die infizierten Waben. Sonstige Bakterienbefunde sind nicht wiedergegeben.

2. Juni: 4 Madenreste; in 2 davon Kokken. — 3. Juni: 6 Madenreste (4 alte und 2 junge Rundmaden), überall Kokken. — 4. Juni: 4 Madenreste von alten Rundmaden; uberall Kokken. — 5. und 6. Juni: 3 und 2 Madenreste von Jungmaden; kein Befund. — 7. Juni: 3 Madenreste; uberall Kokken. Eine Made war verdeckelt, eine Made stammte von einer nichtinfizierten Wabe. — 8. Juni: 2 Madenreste von einer nichtinfizierten Wabe; in einer Made Kokken. — 9. bis 14. Juni: 14 Madenreste; kein Befund. — 14. Juni: Vernichtung des Volkes durch Abschwefeln. — 15. Juni: Bei der letzten Durchmusterung des gesamten Wabenwerkes in 8 stehengebliebenen verdeckelten Zellen Madenreste, davon befanden sich 5 auf nichtinfizierten Waben. In 2 Maden Kokken.

Insgesamt sind somit 46 Madenreste bei täglich je einmaliger Wabendurchmusterung ermittelt worden, von denen in 18 Fällen Kokken färberisch und züchterisch gewonnen werden konnten. Die aufgefundenen Madenreste wiesen eine breiig-schmierige Beschaffenheit auf, ließen in einigen wenigen Fällen noch schwach etwas von der Segmentierung, stets aber einen deutlich wahrnehmbaren säuerlichen Geruch und eine gelbe bis hellbraune Farbe erkennen. Die schmierige Beschaffenheit ist vielleicht als der Grund dafür anzusehen, daß innerhalb der 14tägigen Untersuchungszeit entgegen den sonst bei Ansteckungsversuchen bei der Bienenbrut spärlichen Befunden (vgl. 1934) so viel Madenreste gefunden werden konnten, weil das Herausschaffen der ganzen Brutreste für die Bienen mühsam und zeitraubend war. Bemerkenswert ist, daß mehrfach auch auf nicht infizierten Wabenflächen eine Erkrankung der Brut stattgefunden hatte, ein Beweis dafür, daß die Bienen den Ansteckungsstoff, der in dem die Maden umgebenden Futtersaft enthalten war, im übrigen Stock verbreitet haben. Der Umstand, daß der Futtersaft die Kokken enthielt, erklärt aber auch den frühen Ausbruch der Erkrankung, da die ersten Befunde schon einen Tag nach der Ansteckung gemacht wurden. Als bemerkenswert verdient auch hervorgehoben zu werden, daß der Krankheitszustand 7 Tage hindurch zu beobachten war und daß die Brut vornehmlich im offenen Zustand und nur in Ausnahmefällen erst nach der Zellverdeckelung abgestorben war.

Die in den Madenresten durch Ausstrichpräparate ermittelten Kokken sind alsdann in Reinkulturen gewonnen und 12 von ihnen sind den gleichen Untersuchungen auf ihre Lebenseigenschaften unterzogen worden wie die 4 Stämme 8, 17, 42 und 43 (s. o.). Diese Untersuchungen ergaben eine völlige Übereinstimmung zwischen diesen 4 Stämmen und jenen 12 Madenstämmen, so daß an einer Identität zwischen ihnen, insbesondere zu dem in dem Ansteckungsversuch benutzten Stamm 42 und den wiedergewonnenen Madenstämmen nicht zu zweifeln ist. Der Versuch hat somit eindeutig bewiesen, daß der Streptococcus apis imstande ist, durch künstliche Ansteckung auf dem Fütterungswege die Bienenbrut unter dem gleichen Bild absterben zu lassen wie unter natürlichen Verhältnissen, und daß wir somit den Streptococcus apis nicht als ein harmloses Begleitbakterium bei der Gutartigen Faulbrut ansehen dürfen, sondern als einen selbständigen Krankheitserreger.

Versuch 2 (3. Juni 1934).

Dieser Versuch verlief ohne Ergebnis. Mit der Durchmusterung des Wabenwerkes ist am 5. Tage nach dem Einhängen der Waben begonnen worden; tote Madenreste konnten jedoch in den Zellen und auf dem Bodenbrett nicht ermittelt werden. Offen mußte bei diesem negativen Befund die Frage bleiben, ob die in den Zellen angetrockneten Kokken abgestorben waren oder ob die Bienen die etwa zugrunde gegangene noch in den ersten Entwicklungsstadien gewesene Brut aus den Zellen entfernt hatten und daß sie dann bei ihrer geringen Größe auch auf dem Bodenbrett nicht mehr gefunden werden konnte. Aber auch in den folgenden Tagen blieb der Befund negativ. Bis zum 24. Tag sind insgesamt 8 Madenreste ermittelt worden, die sich jedoch frei von Keimen erwiesen hatten. Ein Absterben von Maden nach der Zellverdeckelung, wie sie in Versuch 1 einige Male vorkam, unterblieb hier jedoch gleichfalls.

B. Versuche an drei bisher bei der Bienenbrut unbekannten Bazillenstämmen.

In einer früheren Veröffentlichung (Dtsch. Imkerf. 1934) ist bereits darauf hingewiesen worden, daß im Frühjahr 1933 in der Biologischen Reichsanstalt besondere Versuche in der Weise vorgenommen worden sind, daß bei drei Bienenvölkern des Versuchsstandes die Mittelwände mit einer Aluminiumverbindung in geringen, aber steigenden Mengen versetzt wurden. Die Bienen zogen diese Mittelwände gut aus und bestifteten sie auch regelrecht und gleichmäßig, aber die Brut starb bereits im ersten Brutgang in allen drei Völkern im Stadium der alten Rundmaden oder kurz nach der Verdeckelung. Ein Zugrundegehen der jungen Rundmaden ist nicht beobachtet worden; das Absterben der Brut in den offenen Zellen fand häufiger statt als in den verdeckelten Zellen.

Was das Aussehen und die Beschaffenheit der toten Brut anbetrifft, so war die Körperhaut in einigen Fällen noch gut erhalten und feucht und ließ die Segmentierung z. T. noch einigermaßen erkennen, der Körperinhalt war jauchig zerfallen oder die toten Maden waren schleimig oder auch trocken, wobei von der Segmentierung nichts zu erkennen war; einen auffallenden Geruch wiesen die toten Tiere nur selten auf, der dann etwas säuerlich war. Die Farbe war entweder braungelb oder gelbbraun, aber niemals dunkelbraun wie bei der Bösartigen Faulbrut. Eine an die Bösartige Faulbrut erinnernde fadenziehende Beschaffenheit wiesen die toten Maden niemals auf.

In den Fällen einer Schwarzverfärbung der Brut besaßen auch die Zelldeckel schwarzbraune Flecken.

Die aus den toten Tieren angefertigten Ausstrichpräparate ließen eine große Menge von Stäbchen erkennen, die fast ausnahmslos Sporen gebildet hatten, und unter denen sich auch der Bac. orpheus befand. Die Zahl der Arten erschien aber begrenzt. Dieser auffallende mikroskopische Befund wurde auch durch das Plattengießverfahren bestätigt, denn es gelang, einige Stämme aus den toten Maden herauszuzüchten, die mehrmals wiederkehrten.

Wenngleich es auch nach dem ganzen Krankheitsbild, das sich auf den Waben bot, keinem Zweifel unterliegen konnte, daß der im Wabenwerk enthaltene Aluminiumzusatz irgendwie zur Auslösung des Zustandes beigetragen hatte, zumal in einigen Maden ein Bakterienbefund völlig zu vermissen war, so erforderte der geschilderte Befund an Keimen im Hinblick auf das noch immer nicht gelöste Problem der Gutartigen Faulbrut vom ätiologischen wie aber auch vom bakteriologischen Standpunkt erhöhtes Interesse. Es war zu ermitteln, ob es sich hier um Keime (Sporenbildner) handelte, die erst nachträglich in die toten Tiere gelangt waren, oder ob diese Keime den Tod selbständig herbeigeführt hatten. Die Beantwortung dieser Frage konnte nur durch Ansteckungsversuche bei der Bienenbrut gesunder Völker erfolgen, worüber im folgenden berichtet wird.

Aus einer großeren Zahl von Maden, etwa 50, die stark in ihrem Aussehen und in ihrer Beschaffenheit verändert erschienen (s. o.), wurden nach Anfertigung von orientierenden Ausstrichpräparaten aus den stark keimhaltig befundenen Madenleichen die Keime in Reinkulturen herausgezüchtet. Hierbei wie bei den Stichproben (s. o.) fielen immer einige wiederkehrende Bazillenarten auf, die sich durch die Form und Größe der Stäbchen und der von ihnen gebildeten Sporen voneinander unterschieden. Ähnlich fielen die kulturellen Prüfungen aus, denn auch in den durch das Plattengießverfahren erhaltenen Kulturen herrschten nur wenige, und zwar drei Typen von Kolonien vor, die sich in Bau, Größe, Form u. dgl. voneinander trennen ließen. Diese drei Bazillenstämme, im folgenden mit VII, IX und XXXI bezeichnet, wurden alsdann zu Ansteckungsversuchen bei der Brut gesunder Bienenvölker vom Versuchsstande der Biologischen Reichsanstalt verwendet. Zur Züchtung der genannten Stämme diente ein schwach alkalischer Vitam-Bact.-Agarnährboden; die Züchtungstemperatur betrug 32°.

1. Prüfung der Lebenseigenschaften der 3 Stämme VII, IX und XXXI.

Form und Große der Stabchen.

Tuschepraparate, Durchschnittsmaße (Minimal- und Maximalmaße) von Länge und Breite.

VII. Gerade mit schwach abgerundeten Enden; 2,1 : 0,9 μ (1,1—2,9 : 0,8—1,0 μ).

IX. Gerade mit etwas abgerundeten Enden; 1,9 : 0,9 μ (1,2—3 : 0,8—1 μ).

XXXI. Gerade mit deutlich, aber spitz abgerundeten Enden; 1,9 : 0,9 μ (1,5—2,2 : 0,8—1,0 μ).

Sporenbildung, Form und Große der Sporen.

VII und IX bilden die Sporen mehr mittel- als endständig, XXXI mehr end- als mittelstandig, wobei sich die Stäbchen trommelschlägerartig aufbauchen.

VII. 1,4 : 0,9 μ (1,0—1,7 : 0,9—1,0 μ).

IX. 1,2 : 0,9 μ (1,1—1,5 : 0,8—1,1 μ).

XXXI. 1,7 : 1,0 μ (1,5—2,0 : 0,9—1,0 μ).

Beginn der Sporenbildung (37°) bei VII nach 24, bei IX nach 40 Std., bei XXXI nach 6 Tagen, Beendigung 6, 8 und 10 Tage auf Nähragar in Schrägröhrchen.

Beweglichkeit. Alle drei Stämme sind peritrich begeißelt und lebhaft beweglich.

Aussehen der Kulturen auf Agarplatten.

VII. Junge, etwa 18 Std. alte Kulturen sind fast kreisrund, etwas erhaben, schmutzig-weißgelb, 1—3 mm im Durchmesser, glänzend, scharfrandig, schwach durchscheinend, feinkörnig, leicht abnehmbar, von schwach aromatischem Geruch; in der Folgezeit neigen die Kulturen zur Bildung von schmalen, rund verlaufenden oder auch rosettenartigen Ausläufern, die mitunter den ganzen Nährboden überziehen können.

IX. Hinsichtlich Form, Farbe, Größe und Bau haben die Kulturen mit denen von VII eine große Ähnlichkeit, sie sind aber weniger zart, erscheinen derber, ebenso wie die von ihnen gebildeten korallenähnlichen Ausläufer.

XXXI. Sehr üppiges Wachstum, denn schon nach 18 Std. können sich bis zu 4 mm große Kolonien gebildet haben. Diese sind unregelmäßig kreisrund, bilden mitunter schwache Ausläufer, sind scharfrandig, gelblich-weiß, flach, mit zuerst mattglänzender, später immer rauher werdender Oberfläche, schwach durchscheinend, ohne besonderen Geruch, leicht, aber etwas stückig abnehmbar, unter der Oberfläche schleimig und von grobkörniger Struktur, die in der Tiefe feinfädig und wurzelartig verflochten erscheint.

Strichkulturen auf Nähragar.

Alle drei Stämme zeigen nach 18 Std. einen kräftigen Belag von gleichem Aussehen; er ist gut glänzend, stark durchscheinend, schmutzig-weiß und im durchfallenden Licht leicht irisierend; das Auspressungswasser ist getrübt. Erst in der Folgezeit machen sich Unterschiede im Aussehen der Kulturen bemerkbar, besonders zwischen XXXI und den beiden anderen. Diese verlieren mehr und mehr ihren Glanz und ihre Farbe und werden auf dem Nährboden immer weniger und schließlich kaum noch sichtbar; XXXI wird rauh, behält aber seine schmutzig-weiße Farbe bei.

Die Färbung gelingt mit den gebräuchlichen Farbstoffen bei allen drei Stämmen gut. Die Gramsche Färbmethode fällt bei VII, IX und XXXI in 24 Std. alten Kulturen bei 2 Min. langer Färbung und ½, 1, 1½ und 2 Min. langer Jodjodkalium-Einwirkung sowohl negativ als auch positiv aus.

Wachstum in Peptonlösung (Witte-Pepton 2,5% + NaCl 0,8%), 14. Tag.

VII. Gutes Wachstum, gleichmäßige Trübung, keine Haut, Bodensatz läßt sich erst zusammenhängend, später stückig aufwirbeln.

IX. Zuerst schwache, dann kräftiger werdende Trübung, zarte, auf der Oberfläche schwimmende Haut, Bodensatz mäßig, läßt sich vollständig zerteilen.

XXXI. Keine Trübung, sehr starke Haut, die auch nach dem Schütteln nicht zerreißt; gallertartig aussehender Bodensatz, der sich beim Schütteln vollständig und gleichmäßig verteilt.

Wachstum auf der Kartoffel.

VII. Gutes Wachstum, schwach gelblich, etwas erhaben, saftig glänzend und schleimig ablaufend. Nach 48 Std. schwach fädig und etwas stückig abnehmbar.

IX. Gutes Wachstum, gelb, flach, matt oder fettig glänzend, nicht schleimig ablaufend, breiig abnehmbar.

XXXI. Sehr gutes Wachstum, schmutzig-weiß, flach, rauh und faltig, schwer und zäh abnehmbar.

Verhalten in Gelatinenährboden.

Alle drei Stämme verflüssigen den Nährboden innerhalb 1—2 Tagen.

Verhalten in Milch.

VII. Vom 12. Tag ab machen sich Gerinnungserscheinungen bemerkbar, die nur langsam stärker werden. Nach 4 Wochen hat sich ein flockiges, zu Boden sinkendes Gerinnsel gebildet, die ausgepreßte Flüssigkeit ist grüngelb gefärbt und stark trübe. Bei Zusatz von Lackmus-Tinktur keine Andeutung einer Reaktions-Änderung; Alizarolzusatz gibt nicht wie bei normaler Milch eine etwa milchschokoladenbraune, sondern eine terrakottabraune Färbung.

IX. wie VII.

XXXI. Bis zum 21. Tag keine Veränderung.

Verhalten in Azolithminlösung nach Seitz (Ztschr. f. Hygiene u. Infektionskrankh. Bd. 39. 1902. S. 283), 14. Tag.

VII. Sehr leichte Trübung, keine Haut, kein Bodensatz, Umschlag in Rotviolett.

IX. Kaum Trübung, sonst wie VII.

XXXI. Zuerst gute Trübung, ab 10. Tag völlig klar, Bildung einer starken, festen Haut, die sich durch Schütteln nur schwer in Stücke teilen läßt, kein Bodensatz, kein Farbumschlag.

Verhalten in Lackmusmolke (Fraenkel u. Landau), 14. Tag.

VII. Gute Trübung, feine, am Rande nicht anhaftende Haut, Bodensatz stark, der sich erst durch kräftiges Schütteln lösen läßt, Flüssigkeit farblos, nimmt nach Zusatz von Lackmuslösung (Kubel und Tiemann) eine leichte Rotfärbung an.

IX. Sehr schwache Trübung, unregelmäßig fetzige Haut, die am Rande anhaftet, starker, beim Schütteln sich lösender Bodensatz im Gegensatz zu der stückig bleibenden Haut. Flüssigkeit farblos, keine Änderung der Reaktion nach Zusatz von Lackmustinktur.

XXXI. Fast klar, sehr starke Haut, Bodensatz gering. Keine Änderung der Reaktion.

Wachstum in eiweißfreier Nährlösung (Proskauer und Beck), 14. Tag.

VII. Kaum Wachstum, keine Haut, kein Bodensatz, keine Änderung der Reaktion.

IX. Sehr schwache Trübung, sonst wie VII.

XXXI. Sehr schwache Trübung, besonders in der oberen Schicht, zuerst sehr schwache, dann stärker werdende Haut, die sich durch Schütteln fetzig zerteilen läßt, kein Bodensatz, keine Reaktionsänderung.

Wachstum in verdünntem Pferdeserum (1 : 10) + Glyzerinzusatz (3%), 14. Tag.

VII. Gute Trübung, starker, fädig-schleimig aussehender Bodensatz, der sich nur schwer verteilt, schwache Haut. Saure Reaktion.

IX. Sehr starke Trübung, kräftiger, aufwirbelbarer, sich leicht verteilender Bodensatz, keine Haut. Saure Reaktion.

XXXI. Zuerst gute Trübung, dann Klärung, sehr starke, feste Haut, mäßiger, beim Schütteln sich leicht verteilender Bodensatz. Saure Reaktion.

Zur Prüfung auf Gas- und Säurebildung ist der Nährboden, z. T. Peptonlösung (Pepton für bakteriologische Zwecke der Firma Fraenkel & Landau) 2,5 + NaCl 0,8%, z. T. 1proz. Nähragar versetzt worden mit Trauben- (1,5), Milch- (3), Rohr- (3), Frucht- (1,5), Malzzucker (1,5), Galaktose (1,5), Raffinose (3), Dextrin (3), Glyzerin (1), Mannit (1%).

Alle drei Stämme bildeten in diesen Kohlehydraten und Alkoholen Säure, aber kein Gas.

Indol wurde von keinem Stamm gebildet. Geprüft nach Ehrlich-Böhme und Kovaćs.

Schwefelwasserstoff bildeten alle 3 Stämme, aber bei mehrfacher Prüfung (mit Bleiazetatpapier und nach Wilson) nicht regelmäßig.

Oxydationswirkung nach Schultze (Zentralbl. f. Bakt. I. Abt. Orig. Bd. 58. S. 544) mit α-Naphthol und Dimethylparaphenylendiamin.

VII.	+
IX.	+
XXXI.	—

Reduktion.

a) Von Nitrat zu Nitrit (in Aqua dest.: Pepton Witte 2,5 + NaCl 0,5 + KNO_3 0,3%) mit α-Naphtylamin und Sulfanilsäure (Grieß und Ilosvay).

VII.	—
IX.	+
XXXI.	+

b) Von Farbstoffen (Lackmus, Methylenblau, Indigoblau): alle drei Stämme stark +.

c) Natr. selenosum und Natr. tellurosum: alle drei Stamme +.

d) Nach Schultze mit α-Naphthol und Nitrosodimethylanilin (a. a. O.): alle drei Stamme +.

Die Untersuchungen zeigen, daß die drei Stämme trotz mancher Übereinstimmungen doch deutliche Unterschiede in ihren Lebenseigenschaften besitzen.

2. Ansteckungsversuche.

Die Ansteckung der Brut erfolgte in der Weise, daß wäßrige Abschwemmungen von Reinkulturen der Stämme VII, IX und XXXI, die in Schrägröhren oder in Petrischalen gut gewachsen waren, mit einer feinen Pipette in die Wabenzellen auf die jungen hierin liegenden Maden geträufelt wurden. Überwiegend fanden hierzu alte, bereits in die Sporenbildung übergegangene Kulturen Verwendung. Die Technik war somit die gleiche wie die bei den Versuchen mit Bac. orpheus (vgl. 3) und Strept. apis (s. o.). Die Aufschwemmungen waren wegen der leichteren Aufnahme durch die Brut bis auf 2 Ausnahmen (s. u.) mit etwa 3—5% Honig versetzt worden.

Bei den einige Tage nach den Infizierungen beginnenden und mehrfach wiederholten Wabendurchmusterungen wurden alle die in den offenen und gedeckelten Zellen liegenden Maden, die irgendwelche sinnfällige Veränderungen aufwiesen, einzeln in sterilen Röhrchen oder Petrischalen gesammelt und bezeichnet und mikroskopisch untersucht. Da hierdurch, besonders bei Vorhandensein nur weniger Keime, jedoch ein unbedingt sicherer Nachweis über den Keimgehalt der Maden nicht geliefert werden konnte, wurden die toten Maden in jedem Fall durch Anwendung des Plattengießverfahrens oder durch Verimpfung eines Madenstückes auf Nährboden geprüft.

I. Versuche mit Stamm VII.

Versuchsreihe a. Volk 20. 13. Juli 1933. 2 Plattenkulturen (Sporen).

21. Juli: 4 tote Maden. Made 1 ungedeckelt; gelbweiß, Segmentierung verwaschen, sehr feucht, kein auffallender Geruch. Ausstrich und Kultur: VII — ähnliche Stäbchen: Nr. 3. Made 2 gedeckelt; bräunlichgelb, formlos, schmierig, kein Geruch. Ausstrich und Kultur: außer derben auch VII — ähnliche Stäbchen: Nr. 4. Made 3 ungedeckelt; braun, eingetrocknet, schwach sauer riechend. Ausstrich und Kultur: —. Made 4 ungedeckelt; hellbraun, saftig, keine Segmentierung, schwach sauer riechend. Ausstrich und Kultur: außer wenigen anderen auch VII — ähnliche Stäbchen: Nr. 5.

24. Juli: 6 tote Maden, ungedeckelt und gedeckelt. Beschaffenheit verschiedenartig: hellgelb bis braun verfärbt, teils trocken und schmierig, teils feucht und etwas saftig, Segmentierung z. T. noch erkennbar, Geruch entweder schwach sauer oder nicht vorhanden. Ausstrich und Kultur: —

27. Juli: 6 tote Maden: Befund wie am 24. Juli.

31. Juli: 36 tote Maden, ungedeckelt und gedeckelt; Beschaffenheit verschiedenartig (s. oben). Ausstrich: in 16 Maden Stäbchen oder Kokken. Kultur: in 14 Maden: —; in 2 Maden (21 u. 48): +. Made 21 ungedeckelt; schmutzig-gelb, etwas jauchig, leicht saurer Geruch. Ausstrich und Kultur: außer anderen auch VII — ähnliche Stäbchen: Nr. 6. Made 48 gedeckelt; trocken, keine Segmentierung, kein Geruch. Ausstrich und Kultur: große Kokken.

Da mit Hilfe des Plattengießverfahrens keine Kulturen aus den Maden gewonnen werden konnten, bei denen aber die Ausstrichpräparate die Gegenwart von Stäbchen erkennen ließen, wurden Madenteile auf Nährboden in Schrägröhrchen übertragen. In 12 Fällen davon kam ein von den Maden-

leichen ausgehendes kräftiges Wachstum zustande. Ausstrich: überall Stäbchen. Kulturen: VII — ähnliche und andere Stäbchen in 6 Fällen: Nr. 34, 36, 43, 44, 45, 47. VII — ähnliche Stäbchen in 3 Fällen: Nr. 37, 39, 41. Die Maden 34, 36, 43, 47, 39 und 41 waren ungedeckelt, die Maden 44, 45 und 37 gedeckelt.

3. August: 32 tote Maden, ungedeckelt und gedeckelt; Beschaffenheit verschiedenartig (s. oben). Ausstrich: in 7 Maden: Stäbchen. Kultur: in 6 Maden: VII — ähnliche Stäbchen; davon in 4 Maden (55, 58, 62 und 63) rein: Nr. 10, 11, 12 und 14, und in 2 Maden (59 und 66) zusammen mit anderen Stäbchen: Nr. 9 und 13. Die Maden 55, 58 und 66 waren ungedeckelt, die Maden 62, 63 und 59 gedeckelt.

10. August: 15 tote Maden, ungedeckelt und gedeckelt; Beschaffenheit verschiedenartig (s. oben). Ausstrich und Kultur: in 6 Maden (85, 88, 91, 94, 95, 98) VII — ähnliche Stäbchen; in einer Made davon (88) rein: Nr. 16; in den übrigen zusammen mit anderen Stäbchen: Nr. 15, 17—20. Die Maden 88 und 95 waren ungedeckelt, die Maden 85, 91, 94 und 98 gedeckelt.

18. August: 4 tote Maden in gedeckelten Zellen: braun, trocken-schmierig, geruchlos (100—103). Ausstrich und Kultur: —

Versuchsreihe b. Volk 19. 15. Juli 1933. 1 Schrägröhrchen (Stäbchen, Aufschwemmung ohne Honig).

18. Juli: 1 tote Made, ungedeckelt; bräunlich-gelb, schmierig, leicht saurer Geruch. Ausstrich und Kultur: VII — ähnliches Stäbchen: Nr. 25.

31. Juli: 2 tote Maden von ähnlicher Beschaffenheit wie oben. Ausstrich und Kultur: —

Versuchsreihe c. Volk 30. 18. Juli 1933. 7 Schrägröhrchen: 3 Sporen- und 4 Stäbchenkulturen.

31. Juli: 1 tote Made, ungedeckelt. Ausstrich und Kultur: Stäbchen, nicht VII — ähnlich.

4. August: 4 tote Maden; 2 gedeckelt, 2 ungedeckelt. In einer Made in Ausstrich und Kultur ein VII — ähnliches Stäbchen: Nr. 2.

Versuchsreihe d. Volk im Beobachtungskasten (mit 2 Ganzwaben). 25. Juli 1933. 1 Petrischale (Sporen).

27. Juli: 1 tote Made gedeckelt; gelb, schmierig, ohne Geruch. Ausstrich und Kultur: VII — ähnliches Stäbchen: Nr. 32.

3. August: 1 tote Made, ungedeckelt; braunlich-gelb, jauchig. Ausstrich und Kultur: —

11. August: 1 tote Made, gedeckelt; braungelb, schmierig, ohne Geruch. Ausstrich und Kultur: VII — ähnliches Stäbchen: Nr. 53.

Ergebnis der Ansteckungsversuche mit Stamm VII.

In 4 Versuchen sind 114 (103 + 3 + 5 + 3) tote Maden, teils im ungedeckelten, teils im gedeckelten Zustand in den Versuchsvölkern gefunden worden. Wie die gefärbten Ausstriche und die darauffolgenden Kulturversuche erkennen ließen, waren jedoch 85 Maden (75%) von VII — ähnlichen Stämmen nicht ergriffen worden, da in ihnen, wie es meistens der Fall war, entweder überhaupt kein Bakterienwachstum nachzuweisen war oder es sich um andere, dem Stamm VII nicht ähnelnde Stäbchen oder um Kokken handelte. In 29 Maden (25%) aber war je ein VII — ähnlicher Stamm sowohl im Ausstrich als auch in der nachfolgenden Kultur wieder zu ermitteln, und zwar war er in 13 Fällen hiervon rein, in den übrigen 16 Fällen zusammen mit anderen Stäbchen vorhanden. — Die hohe Zahl der nichtbefallenen Maden erklärt sich daraus, daß ein Teil der Tiere, besonders die alten Rundmaden, durch das Einbringen der Ansteckungsmasse in die Wabenzellen aus ihrer normalen Lage gebracht werden, die sie dann nicht wieder einnehmen und schließlich absterben, ohne jemals infiziert worden zu sein.

Versuchsreihe e.

Das Ergebnis der Ansteckungsversuche mit Stamm VII verdient dadurch noch eine besondere Beachtung, als es gelang, gerade zu der Zeit, als diese Versuche im Gange waren, aus erkrankter Brut in Wabenwerk, das der Biologischen Reichsanstalt zwecks Untersuchung übersandt worden war, in einem Falle einen Bazillus zweimal zu gewinnen, der eine sofort auffallende Ähnlichkeit und, wie die späteren vergleichenden Untersuchungen bestätigten, eine Übereinstimmung mit Stamm VII aufwies.

Das Wabenwerk der in Frage stehenden Sendung stammte aus Schildow bei Berlin (Ende Juli 1933). Das Volk war weisellos und fiel dem Besitzer, einem erfahrenen Imker, durch trägen Flug auf. Auf einer Wabe — ob mehrere Waben mit verdächtiger offener und gedeckelter Brut vorhanden waren, ließ sich nicht feststellen — waren tote Maden vorhanden, die nach dem Bericht zum größten Teil zwar schwach, aber deutlich, in einem Falle sogar auffallend stark fadenziehend waren, so daß der Verdacht der Bösartigen Faulbrut gerechtfertigt war, zumal die schleimigen Maden gelb und dunkelbraun verfärbt und die Zelldeckel eingefallen waren.

Zur näheren Untersuchung konnten hier nur 3 Maden verwendet werden: 2 verdeckelte und 1 unverdeckelte, die alle braun bis schwarzbraun, schmierig und schwach, aber deutlich fadenziehend und ohne Geruch waren. Aus 2 Maden konnten mit Hilfe des Plattengießverfahrens 2 Stämme isoliert werden: aus verdeckelter Zelle: **A**; aus unverdeckelter Zelle: **B**.

Volk 5. 31. Juli 1933. 1 Schrägröhrchen(Sporen-)kultur von A.

3. August: 2 tote Maden in gedeckelten Zellen, von brauner Farbe, schmieriger Beschaffenheit, ohne Geruch. Ausstrich und Kultur: 2 A — und B — und gleichzeitig VII — ähnliche Stäbchen: C und D.

II. Versuche mit Stamm IX.

Volk 14. 13. Juli 1933. 2 Plattenkulturen (Sporen).

21. Juli: 2 tote Maden, ungedeckelt. Made 1 gelblich-weiß, Segmentierung erscheint etwas verwaschen. Ausstrich und Kultur: —; Made 2 braungelb, klumpig, formlos, etwas zäh-fadenziehend, schwach sauer riechend. Ausstrich und Kultur: IX — ähnliches Stäbchen: Nr. 117.

31. Juli: 2 tote Maden, ungedeckelt, nichts besonderes. Ausstrich und Kultur: —

3. August: 4 tote Maden, gedeckelt. Die Maden 5, 7 und 8 ohne besondere Merkmale im Aussehen. Ausstrich und Kultur: —; Made 6 gelb, am Kopfteil braun, etwas jauchig zerfallen, ohne besonderen Geruch. Ausstrich und Kultur: außer anderen auch IX — ähnliche Stäbchen: Nr. 118.

10. August: 10 tote Maden, 2 ungedeckelt (13 und 15), die übrigen 8 (9—12, 14, 16—18) gedeckelt. Gelb bis braun, alle schmierig, keine Gliederung mehr zu erkennen. Kein auffallender Geruch. Ausstrich und Kultur: in den Maden 13, 16 und 18 sind nur IX — ähnliche Stäbchen: Nr. 120, 121, 122, aber in Made 11 in schwachem Maße zusammen mit einer anderen Stäbchenart vorhanden: Nr. 119.

18. August: 1 tote Made gedeckelt; beschaffen wie die Maden am 10. August. Ausstrich und Kultur: IX — ähnliche Stäbchen: Nr. 123.

11. September: 3 tote Maden, gedeckelt. Ausstrich und Kultur: —

Ergebnisse der Ansteckungsversuche mit Stamm IX.

Insgesamt sind 22 tote Maden, zumeist (16) im gedeckelten Zustand angetroffen worden. In 7 Maden ist der IX — ähnliche Stamm wieder angetroffen worden, und zwar fünfmal rein und zweimal zusammen mit anderen Stäbchen.

III. Versuche mit Stamm XXXI.

Volk 33 a. 26. Juli 1933. 2 Plattenkulturen (Sporen), ohne Honig verfüttert.

Die Untersuchung der infizierten Brut konnte aus äußeren Gründen nur einige wenige Male vorgenommen werden; das Versuchsvolk war an einer etwa 4 km weit entfernten Stelle aufgestellt.

29. September: 3 tote Maden, ungedeckelt; gelblich-weiß, schmierig, ohne besonderen Geruch. Ausstrich und Kultur: XXXI — ähnliche Stäbchen: Nr. 48, 49, 50.

1. August: 2 tote Maden, wie oben. Ausstrich und Kultur: XXXI — ähnliche Stäbchen: Nr. 51, 52.

12. August: 1 tote Made, gedeckelt; vertrockneter Eindruck. Ausstrich und Kultur: —

Ergebnis der Ansteckungsversuche mit Stamm XXXI.

Zusammen sind 6 tote Maden angetroffen worden, von denen 5, die sämtlich ungedeckelt waren, den XXXI — ähnlichen Stamm aufwiesen, und zwar ohne Beimengung anderer Stäbchen.

Vergleichende Untersuchungen an den Infektions- und Madenstämmen.

Als Ergebnis der Ansteckungsversuche ist in den vorliegenden Protokollen der Befund von insgesamt 43 (29 + 7 + 5 + 2), aus toten Maden stammenden Stäbchen aufgeführt worden, die gruppenweise nach ihren morphologischen und kulturellen Merkmalen eine Ähnlichkeit mit den drei Infektionsstämmen VII, IX und XXXI aufwiesen. Zur Feststellung, ob es sich bei den „Madenstämmen“ um die gleichen handelt wie bei den entsprechenden Infektionsstämmen, sind deren Lebenseigenschaften in der gleichen Weise geprüft worden wie die der Stämme VII, IX und XXXI (s. o.). Hierbei ist jedoch davon abgesehen worden, sämtliche in den drei Infektionsreihen VII, IX und XXXI gewonnene Madenstämme zu untersuchen. Von den 29 Madenstämmen der Reihe VII sind nur 11 geprüft worden (Nr. 2, 3, 5, 10, 11, 12, 14, 16, 25, 37 und 41), von den 7 Madenstämmen der Reihe IX nur 5 (Nr. 48, 49, 50, 51 und 52); dann alle 5 der in der Reihe XXXI gewonnenen Madenstämme sowie die 4 Stämme A. B, C und D der Versuchsreihe e. In allen diesen Untersuchungen dienten die drei Infektionsstämme zu Vergleichszwecken als Kontrollen. — Bemerkt sei noch, daß in diese Untersuchungsreihen noch einige weitere Bazillenstämme eingeschaltet worden sind, die mehrfach in toter Bienenbrut nachgewiesen werden konnten und die bei der verhältnismäßig großen Zahl der von ihnen befallenen Tiere an deren Zugrundegehen offenbar nicht ohne Einfluß waren. Während der Durchführung dieser Untersuchungen sind jedoch noch weitere derartige in ihrer Bedeutung für die Bienenbrut noch nicht klar erkannte Bazillenarten gefunden worden. Die Untersuchungsergebnisse hierüber werden später zusammenfassend veröffentlicht werden, so daß von einer Wiedergabe von Teilergebnissen hier abgesehen worden ist, zumal auch Infektionsversuche mit den bisher untersuchten Keimen noch nicht vorgenommen worden sind.

Nach Abschluß dieser Untersuchungen sind die Vergleiche zwischen den Infektions- und Madenstämmen auch auf serologischem Wege mit Hilfe der Agglutinationsmethode vorgenommen worden. Durch intravenöse Injektion bei Kaninchen sind Immunsera mit abgetöteten Kulturen

(56°) der Stämme VII, IX und XXXI sowie je eines Alvei- und Orpheusstammes gewonnen worden. Die Agglutinine traten schon sehr bald nach der Behandlung der Kaninchen auf und erreichten nach 14 Tagen den Titer 1 : 8000. Die 5 Sera dienten zur Prüfung aller Madenstämme jeder Gruppe; die Verdünnungen waren 1 : 50, 1 : 100, 1 : 200, 1 : 400, 1 : 500, 1 : 800, 1 : 1000, 1 : 1600, 1 : 2000, 1 : 4000, 1 : 8000. Das Ergebnis wurde nach 24stünd. Aufenthalt der Röhrchen bei Zimmertemperatur abgelesen. In der nachfolgenden Tabelle, die oben horizontal die Immunsera und links vertikal die Madenstämme bezeichnet, sind — nicht in Verhältnis-, sondern in ganzen Zahlen — die Agglutinationstiter wiedergegeben.

Aus der Tabelle ist zu ersehen, daß die drei Immunsera VII, IX und XXXI die gruppenweise zusammengehörenden Madenstämme von einigen etwas tiefer liegenden Ausnahmen (1 : 2000 und 1 : 4000) abgesehen, in den Verdünnungen 1 : 8000 agglutinierten. Eine charakteristische Agglutination der Madenstämme durch die nichtzugehörigen Immunsera kam jedoch nicht zustande bis auf die Madenstämme der Reihe VII, die mit dem Immunserum IX in den Verdünnungen 1 : 800 bis 1 : 1600 eine deutliche Agglutination erkennen ließen. Diese Erscheinung steht mit den vielen Übereinstimmungen, die die Stämme VII und IX aufweisen, im Einklang, rechtfertigt jedoch nicht den Schluß auf eine Identität dieser beiden Stämme.

Die beiden Alvei- und Orpheus-Immunsera agglutinierten die Madenstämme in keinem Fall.

	VII	IX	XXXI	Bac. Orpheus	Bac. Alvei
VII	8000	800	500	800	200
2	8000	1000	500	500	—
3	8000	1000	400	500	—
5	8000	1000	500	500	200
10	8000	800	500	500	—
11	8000	800	500	500	—
12	8000	1000	500	500	—
14	4000	800	500	500	100
16	8000	800	600	800	—
25	8000	800	500	500	—
37	8000	1000	500	500	—
41	8000	1000	600	800	200
A	8000	1000	800	800	200
B	2000	800	600	400	100
C	8000	1600	800	500	100
D	8000	1000	800	800	200
IX	200	8000	200	100	100
17	200	8000	200	100	—
20	200	8000	400	100	—
21	200	4000	200	100	100
22	200	8000	200	100	—
23	200	8000	200	100	—
XXXI	200	200	8000	100	200
48	200	200	8000	100	—
49	200	200	2000	100	100
50	200	200	8000	100	—
51	200	200	8000	100	—
52	200	200	8000	100	—
Alvei	150	200	300	500	8000
Orpheus	200	100	200	4000	400

Das Ergebnis der vergleichenden morphologischen und biologischen Untersuchungen ist dahin wiederzugeben, daß die gruppenweise zusammengehörenden Madenstämme in allen ihren geprüften Lebenseigenschaften mit den entsprechenden Infektionsstämmen vollständig übereinstimmten. Eine Wiedergabe der einzelnen Untersuchungsgänge und -ergebnisse erübrigt sich daher. Danach glichen:

Stamm	VII	den Madenstämmen	2, 3, 5, 10, 11, 12, 14, 16, 25, 37 und 41 sowie A, B, C und D,
„	IX	„ „	17, 20, 21, 22 und 23,
„	XXXI	„ „	48, 49, 50, 51, 52.

Zusammenfassung und Schluß.

Entgegen der in letzter Zeit hauptsächlich von amerikanischer Seite geäußerten Ansicht von einem pleomorphen Lebenszyklus des vermeintlichen Erregers der Gutartigen (Europäischen) Faulbrut, in dem der Streptococcus apis nur ein Stadium darstellt, für das Zustandekommen der Krankheit aber von wesentlicher Bedeutung sein soll, wird in der vorliegenden Arbeit der Streptococcus apis als ein selbständiger Mikroorganismus aufgefaßt. Er ist kein „Begleitbakterium“ im Rahmen der sog. Gutartigen Faulbrut und steht mit den hierbei beobachteten „Begleitbakterien“ in seiner Entwicklung auch nicht in Beziehung.

Die vorliegenden Untersuchungen und der Ansteckungsversuch haben gezeigt, daß der Streptococcus apis imstande ist, auf dem Wege der Einbringung der Ansteckungsmasse in den Futterbrei der Bienenbrut diese zum Absterben zu bringen. Das hierbei zutage getretene Krankheitsbild deckte sich völlig mit dem, das sich unter natürlichen Verhältnissen bietet.

Die Identität des Infektionsstammes und der aus den Maden des Versuchsvolkes gewonnenen Stämme mit dem echten Streptococcus Maaßen kann durch die vorgenommenen vergleichenden Untersuchungen als gesichert angesehen werden.

Hiernach ist der Streptococcus apis als Krankheitserreger im üblichen Sinne des Wortes zu beurteilen, und es erscheint angebracht, die von ihm ausgelöste Bruterkrankung aus dem Komplex der sog. Gutartigen Faulbrut herauszunehmen und sie mit der erstmalig von Burri gewählten Bezeichnung „Sauerbrut“ zu belegen.

Andererseits erscheint es erforderlich, den Rahmen der Gutartigen Faulbrut weiter als bisher zu spannen, diese nicht als eine einheitliche, auf einen bestimmten Mikroorganismus zurückzuführende Krankheit aufzufassen, sondern als eine Gruppe von vielen selbständig nebeneinander, mitunter vielleicht auch gleichzeitig miteinander verlaufenden Krankheiten. Diese Krankheiten ähneln sich in ihrem Verlauf und in ihren Erscheinungen; als ihre Verursacher sind die verschiedensten Bakterienarten anzusehen. Nicht nur die bereits durch den Bac. orpheus vom Verfasser durch Ansteckungsversuche ausgelöste Erkrankung und die vielen Hinweise in der Literatur auf sog. Mischinfektionen bei Bienenbrut-Erkrankungen geben dieser Ansicht eine Stütze, sondern vor allem die in der vorliegenden Arbeit geschilderten Untersuchungen und Ansteckungsversuche mit drei aus toter Brut gewonnenen Bazillenstämmen.

Die Identität der zu diesen Ansteckungsversuchen benutzten Stämme und der aus den krankgemachten Maden wiedergewonnenen „Madenstämme" erscheint durch vergleichende biologische, morphologische und kulturelle Untersuchungen sichergestellt.

Bei diesen Infektionsversuchen kam es weniger darauf an, diese Stämme zu Krankheitserregern zu stempeln, als vielmehr zu zeigen, daß ein Absterben der Bienenbrut unter dem Bilde der Gutartigen Faulbrut auch auf Keime zurückgeführt werden kann, die bisher in der Bienenpathologie noch unbekannt waren. Im Hinblick auf sonstige auffallende Bakterienbefunde in Fällen starken Brutsterbens und unter Berücksichtigung der in der Literatur angeführten „Mischinfektionen" liegt die Vermutung vor, daß sich die Zahl der Verursacher der einzelnen Krankheiten im Rahmen der Gutartigen Faulbrut noch vermehren wird.

Literatur.

Borchert, A., Untersuchungen über die Lebenseigenschaften des bienenpathogenen Bac. orpheus sowie Bemerkungen über Durchführung und Erfolgsaussichten von Ansteckungsversuchen bei Bienenvölkern. (Ztschr. f. Infektionskrankh. d. Haustiere. Bd. 47, H. 1. 1934. S. 60—76.) — Borchert, A., Untersuchungen über eine durch Bac. orpheus hervorgerufene Brutkrankheit bei der Honigbiene. (Deutscher Imkerführer. Nr. 3. 1934.) — Borchert, A., Untersuchungen über die krankheitserregende Wirkung des Bac. orpheus bei der Bienenbrut. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. S. 1—3.) — Burnside, C. E., Studies on the Bacteria Associated with European Foulbrood. (Journ. of Econ. Entomol. Vol. 27. Nr. 3. June 1934.) — Burri, R., Bakteriologische Untersuchungen über die Faulbrut und Sauerbrut der Bienen. Aarau 1906. — Falkner, H. C., Foulbrood. (Bee World. 1932. p. 5.) — Foster, R. E., and Burnside, C. E., Parafoulbrood. (Gleanings in Bee Culture. No. 2. 1933. p. 86—89.) — Harrison, F. C., The Foul-Brood of Bees. Bac. alvei (Cheshire and W. Cheyne). (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 6. 1900. S. 421, 457, 481 u. 513.) — Lochhead, A. G., Studies on the Etiology of European Foulbrood. (IV. Intern. Congr. Entom. Vol. 2, Transach. 1928. p. 1005—1009.) — Lochhead, A. G., The Etiology of European Foulbrood. (Science. Vol. 67. Nr. 1728. 1928. p. 159—160.) — Maaßen, A., Zur Ätiologie der sogenannten Faulbrut der Honigbienen. (Arb. a. d. Kais. Biol. Anstalt. Bd. 6. S. 53—70.) — Maaßen, A., Weitere Mitteilungen über die seuchenhaften Brutkrankheiten der Bienen, insbesondere über die Faulbrut. (Mitt. a. d. Kais. Biol. Anstalt. H. 14. 1913. S. 48—58.) — Morgenthaler, O., Die anzeigepflichtigen Bienenkrankheiten. (Schweiz. Arch. f. Tierheilkde. H. 5. 1924.) — Morgenthaler, O., Bienenkrankheiten im Jahre 1930—1933. (Schweiz. Bienenztg. Nr. 4. 1931; Nr. 5. 1932; Nr. 5. 1933; Nr. 5 a u. b. 1934.) — Morison, Foulbrood in Great Britan. (Bee World. 1933. p. 18.) — Phillips, E. F., Gibt es eine Beziehung zwischen den mineralischen Bestandteilen des Honigs und der „Faulbrut"? (Archiv f. Bienenkde. Bd. 13. S. 66—75.) — Sturtevant, A. P., Mixed Infektion in the Brood Diseases of Bees. (Journ. of Econ. Entom. Vol. 14. Nr. 1. 1921. p. 127—134.) — Toumanoff, Ch., Les Maladies bactériennes du Couvain des Abeilles. Paris 1928. — Wharton, R. A., Etiology of European Foul-Brood of Bees. (Science. Vol. 66. Nr. 1715. 1927.) — White, G. F., The Bacteria of the Apiary. (U. S. Dep. of Agric. Bur. of Entom. Techn. Ser. No. 14. Wash. 1906.) — White, G. F., European Foulbrood. (U. S. Dep. of Agric. Bull. Nr. 810. Prof. Paper, Wash. D. C. 1920).

Referate.

Allgemeines und Methodisches.

Witte, J., Über eine modifizierte Kolleschale in Verbindung mit einem geeigneten Halter für Petrischalen. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 380—382.)

Die bisher gebräuchlichen Kulturkolben haben entweder den Nachteil, daß die für die Beimpfung vorgesehene Öffnung sehr groß ist und eine Verunreinigung bei der Beimpfung vorkommen kann (Kolle-Schalen), oder sie weisen Ecken auf, die beim Beimpfen und bei der Reinigung nicht oder schwer erreichbar sind (Roux-Form). Diese Fehler vermeidet ein Kulturkolben, der nach den Angaben Verf.s von der Fa. Wagner & Munz, München, hergestellt wird. Der Kolben besitzt etwa die Größe einer Petrischale, die Öffnung ist 27 mm breit und 20 mm hoch. Sie ist ausreichend, um die Beimpfung mit einer Platinöse oder einem Drahtspatel auf der ganzen Fläche zu gestatten. Der Übergang vom Hals der Schale zur nutzbaren Fläche ist im Winkel von 45° abgesetzt, damit das Nährbodenmaterial nicht in den Hals übertritt. Bei der Reinigung ist jede Stelle der Impffläche trotz der engen Öffnung gut erreichbar. Die Größe und Form der Kolben gestatten auch die Verwendung eines Halters. Falls erforderlich, läßt sich mit diesem Plattengestell noch ein Halter für Röhrchen verbinden. Genaue Maße hierfür sind im Orig. angegeben.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hruszek, H., Über ein Miniatur-Kulturverfahren zum Studium des makro- und mikroskopischen Wachstums der pathogenen Hautpilze. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 378—380.)

Beschreibung einer Methodik, die auf festem Nährboden unter Verwendung von hohlgeschliffenen Objektträgern außer der täglichen Kontrolle des mikroskopischen Wachstums eine makroskopische Diagnose nach der Form des Pilzwachstums erlaubt und für das eingehende Studium von Pilzen außerordentlich geeignet erscheint. Extrastarke Objektträger mit tiefem Ausschliff nach Maximow werden nach der Sterilisierung auf einer mit Aq. dest. gut angefeuchteten sterilen Zellstofflage in steriler Petri- oder Kolle-Schale ausgelegt. In den Ausschliff des Objektträgers tropft man mit einer Pipette verflüssigten Nährboden (etwa 0,1, 0,2 oder 0,4 ccm). Dann Verschließen der Petrischale bis zur Erstarrung des Nährbodens und schließlich Beimpfung der Nährbodenmitte mit einer möglichst kleinen Menge von der Kultur des zu untersuchenden Pilzstammes. Keine Überlagerung der Kultur mit Deckglas! Aufbewahrung der Kultur bei Zimmertemperatur an staubgeschützter Stelle. Im allgemeinen spielen Verunreinigungen keine Rolle, ebensowenig Austrocknung des Nährbodens auch bei längerer täglicher Beobachtung, wenn hin und wieder einige Tropfen Aq. dest. auf den Zellstoff geträufelt werden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Goldin, M., Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung der Mikroorganismen. (Microbiology. Vol. 3. No. 2. 1934. p. 274—276.) [Russisch.]

Die Methode besteht im wesentlichen aus folgendem. 40—50 Stecknadeln werden auf ein rundes Korkstück gesteckt. Bei Untersuchung einer

Flüssigkeit werden die Stecknadelköpfe in dieselbe eingesenkt und darauf ein Abdruck auf der Agarschale ausgeführt. Durch Wiegen der Schale vor und nach der Impfung wurde festgestellt, daß auf diese Weise eine bestimmte Menge Flüssigkeit auf den Nährboden getragen wird, von 40 Stecknadelköpfen im Durchschnitt 17 mg. Die Zahl der Mikroorganismen in 1 ccm der untersuchten Flüssigkeit beträgt — $\frac{RCK}{1000}$, wo R die gegebene Konzentration, C die Zahl der Kolonien, K den Koeffizienten des Apparates bezeichnet. Diese Impfmethode gibt zuverlässigere Ergebnisse als die von Koch, indem sie Antagonismuserscheinungen beseitigt, und ist bei Zählung fettzersetzender Mikroorganismen besonders zu empfehlen.

A. Imšenecki (Leningrad).

Drobotko, W., Färbung toter Mikroben, als Reaktiv für den Zustand der Mikrobenmembran. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 75—78.) [Russisch.]

Es wird eine Färbemethode beschrieben, die es ermöglicht, tote Bakterien von lebenden zu unterscheiden. Das Präparat wird 2 Min. in der Lösung Nr. 1 gefärbt (3% wässerige Kongorotlösung 100,0, gesättigte Sublimatlösung 4,0). Nachdem das Präparat mit HCl angesäuertem Wasser gewaschen ist, wird es in der Lösung Nr. 2 gefärbt (absol. Alkohol 100,0, Salzsäure 30,0, saures Fuchsin bis zur Sättigung). Bakterien, die vor der Fixierung des Präparates lebendig waren, färben sich rot, während tote Bakterien grau-schwarz gefärbt werden. Diese Methode hat nur mit gramnegativen Bakterien Erfolg, deren Membran sich bei toten Bakterien verändert und kolloide Farben durchläßt. A. Imšenecki (Leningrad).

Johns, C. K., The evaluation of the germicidal potency of chlorine compounds. I. Hypochlorites. (Scientific Agriculture. Vol. 14. 1934. p. 585—607.)

Verf. hat die keimtötende Wirkung einer Anzahl von hypochloridhaltigen Mitteln nach verschiedenen Verfahren untersucht. Dabei hat er auch zwei neue Methoden ausgearbeitet, eine biologische mit Staphylococcus aureus in einem Milchhäutchen und eine ph-Bestimmungsmethode, die beide gute Ergebnisse zeitigten. Offensichtlich ist der ph-Wert der Lösung von größerem Einfluß auf die Wirkung als die Konzentration der Chlorionen, namentlich in verdünnten Lösungen. Deshalb ist ersterer in Zukunft bei Festsetzung der wirksamsten Konzentrationen mehr zu beachten. Braun (Berlin-Dahlem).

Gelei, I. v., Amöbenforschung und Silbermethoden. (Zool. Anzeiger. Bd. 108 3. 4. 1934 10. S. 92—95, 2 Abb.)

Durch die nassen Silbermethoden des Verf.s und seiner Schule kann das Oberflächenhäutchen der Amöben mit aller Klarheit dargestellt werden. Sie heben sich dann von ihrer biocönotischen Umgebung klar ab. Das Häutchen färbt sich in verschiedenen Körperteilen verschieden stark; es ist nicht überall gleich stark, an den Pseudopodien dünner, am Eingang der Schluckvakuole dicker. Neben anderen Einzelheiten, deren Erkennen die genannten Methoden ermöglichen, kann auch beobachtet werden, daß es Amöben gibt, bei denen sich eine Verdauungsblase nicht ablöst, nicht im Entoplasma zirkuliert, sondern bei denen die Verdauung in einem zeitweiligen „Darmrohr" vollendet wird. Man kann sämtliche Pseudopodien leicht zählen, auch die

Anzahl der A. in einem gegebenen Milieu. Es werden einige Angaben über die Technik der Untersuchung gemacht (in Glyzerinalkohol oder auch in 1 proz. Silbernitratlösung). K. Friederichs.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virus-Untersuchungen.

Gronchi, V., et Costantini, A., Phases "S" et "R" du B. typhique et pouvoir bactéricide normale du sang. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 13—16.)

Da die virulenteren Stämme verschiedener pathogener Bakterien der bakteriziden Wirkung normalen Blutes besser widerstehen als die weniger virulenten Stämme, und da anderseits die Umwandlung eines S-Stammes in die R-Form gewöhnlich auch von einer Abnahme der Virulenz begleitet ist, haben sich Verff. die Frage gestellt, ob etwa die S-Form von Bact. typhi die bakterizide Wirkung des Blutes besser überdauert als die R-Form. Die Frage konnte im allgemeinen bejaht werden, wodurch die bestehenden Anschauungen über Dissoziationsform, Virulenz und Widerstandsfähigkeit einer Bakterienart erneut eine Bestätigung gefunden haben.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Guerrini, G., A propos de l'action des lumières monochromatiques sur les putréfactions et sur les fermentations déterminées „in vitro" par le „Bac. proteus vulgaris". (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 124—126.)

Dieser Bericht ist als Ergänzung zu den bereits früher von Verf. mitgeteilten Untersuchungen an Saccharomyces cerevisiae zu betrachten. Diesmal wurde die Menge Gases gemessen, die aus Eiweiß, Zuckern und Lipoiden durch das Bakterium entbunden wurde, und zwar sowohl in völliger Dunkelheit, als auch in weißem, rotem, gelbem, grünem und blauem Licht. Die relativen Werte sind in entsprechender Reihenfolge: 1, 1,07, 0,95, 1,18, 1,59, 0,53. Demnach wirkt also Licht mittlerer Wellenlänge deutlich fördernd, während die langwelligen und die kurzwelligen Teile des Spektrums einen schwach bzw. stark hemmenden Einfluß ausüben. Bortels (Berlin-Dahlem).

Hansen, M., Breuer, H. und Gaag, F. E., Über die Vermehrung der Spaltpilze nach der Einsaat in flüssige Nährmittel. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 131. 1934. S. 469—477.)

I. Über die Wachstumskurve verschiedener Spaltpilze. (Hansen.)

Während bei B. anthracis, B. mycoides und Strept. pyogenes haemolyticus die Keimzahl nach dem Einimpfen in frische Nährbrühe rasch abnahm, um dann in ausgesprochen flachem Verlauf langsam anzusteigen, gingen die Wachstumskurven von Bact. coli, pyocyaneum, typhi, paratyphi A und B und von Strept. pyogenes non haemolyticus nach kurzem Abfall der Kurve meist steil in die Höhe. Microc. pyogenes aureus hatte dagegen einen ausgesprochen unregelmäßigen Verlauf. Wurde der frischen Nährbrühe vor der Beimpfung mit 24 stünd. Brühekulturen Filtrat alter Kulturen zugesetzt, so zeigte sich im Vergleich zu den Wachstumskurven ohne Filtrat-

zusatz, daß flachwüchsige Mikroorganismen steile Wachstumskurven ergaben (Anthrax, Strept. pyogenes haemolyticus), steilwüchsige Mikroorganismen hingegen flache Kurven (Coli, Strept. pyogenes non haemolyticus).

II. Über die Wachstumskurven von Corynebact. diphtheriae und Corynebact. pseudodiphtheriticum. (Breuer.)

Echte Diphtheriebakterien zeigten im allgemeinen Steilkurven, Pseudodiphtheriebakterien Flachkurven. Da aber zahlreiche Übergänge und Abweichungen vorkamen, ist die Wachstumskurve bei diesen Bakterien diagnostisch nicht verwertbar.

III. Die Virulenz in den verschiedenen Abschnitten der Wachstumskurve des Milzbrandbazillus. (Haag.)

In der Zeit des stärksten Abfalls der Zahl der wuchsfähigen Keime trat nicht, wie zu erwarten war, eine Verminderung der Pathogenität ein, sondern im Gegenteil eine deutliche Erhöhung. Auch in denjenigen Fällen, in denen nach 1—2 Std. keine Keime mehr feststellbar waren, blieb nicht nur das virulente Agens in der Züchtungsflüssigkeit vorhanden, sondern zeigte in dieser Zeit sogar größere Pathogenität als in den anderen Zeitabschnitten der Wachstumskurve, in denen zahlreiche wuchsfähige Keime mit Hilfe des Gußplattenverfahrens zu finden waren. Es wurden aber auch Ausnahmen von dieser Regel beobachtet.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Lewis, K. H., and McCoy, E., Root Nodule Formation on the Garden Bean, studied by a Technique of Tissue Culture. (Bot. Gazette. Vol. 95. 1933. p. 316—329.)

Verff. suchten die Frage zu klären, ob die Bildung von Knöllchen durch ein von der Wurzel oder von dem Sproß ausgeschiedenes Exkret stimuliert wird. Sie benutzten zu ihren Untersuchungen die Technik von Wilson: Pflanzen wurden unter sterilen Bedingungen auf Agar im Dunkeln kultiviert. Bei einem Teil wurden nach der Keimung die Wurzeln abgeschnitten, die Sprosse jedoch mit ihren Stengeln im Agar belassen. Bei einem anderen Teil wurden die abgeschnittenen Sprosse entfernt, so daß nur die Wurzeln im Agar blieben. Bei einem dritten Teil waren neben den abgeschnittenen noch die Adventivwurzeln des Sprosses im Agar verblieben. Schließlich wurden auch völlig intakte Pflanzen verwandt. Alle Kulturen wurden dann, je nachdem ob Bohne oder Wicke, mit Rhizobium phaseoli oder Rh. leguminosarum beimpft. Überall trat zwar Knöllchenbildung ein, jedoch war diese sehr gering. In histologischer Beziehung waren die Knöllchen normal entwickelt. Reservestärke wurde nicht gefunden. Auf Grund ihrer Versuche können Verff. nicht entscheiden, ob von dem Sproß oder der Wurzel Stoffe abgegeben werden, die eine Infektion durch Knöllchenbakterien fördern oder hemmen. Skallau (Berlin).

Thomas, J. B., Growth of Actinomyces maculatus (Millard) in various solutions. [Wachstum von Actinomyces maculatus (Millard) in verschiedenen Lösungen.] (Meded. van het Phyt. Lab. Willie Commelin Scholten. H. 13. 1934. S. 47—57, m. 1 Tab.)

Verf. züchtete Actinomyces maculatus in Erlenmeyer-

Kölbchen mit je 25 ccm. Nährlösung und untersuchte den Einfluß verschiedener C- und N-Quellen, sowie verschiedene ph-Stufen und schließlich den Einfluß von Ca als Ersatz für K. Die beste C-Quelle ist Amylum, weniger gut Glukose, schlecht Saccharose. Die beste N-Quelle wird gegeben als KNO_3. Ammoniakstickstoff ist nicht geeignet. Das optimale Wachstum wird erreicht, wenn die Nährlösung neutral reagiert, Ca kann mit Erfolg K ersetzen und beeinflußt das Wachstum und die Sporenbildung günstig.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Castellani, E., Recherches préliminaires sur le biologie de quelques Rhizoctones. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 117—119.)

Von der Gattung Rhizoctonia, zu der einerseits Arten gehören, die bei Orchideen typische Mykorrhyzen bilden, und anderseits solche, die mehr oder weniger ausgeprägt pflanzenpathogene Eigenschaften besitzen, wurden 8 verschiedene Arten aus dem Wurzelbereich einiger höherer Pflanzen isoliert. 6 dieser Stämme werden als neue Arten angesehen, und alle 8 werden in 2 große, morphologisch und physiologisch verschiedene Gruppen eingeteilt, von denen die eine schwächere und die andere stärkere Parasiten enthält. Bortels (Berlin-Dahlem).

Castellani, E., Recherches morphologiques et systematiques sur quelques Rhizoctones. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 119—121.)

Auf Grund umfangreicher vergleichender Studien nimmt Verf. eine Neueinteilung der Gattung Rhizoctonia vor, die sehr heterogen zusammengesetzt ist, d. h. Pilze enthält, die zu den Lebenskreisläufen verwandtschaftlich sehr weit voneinander entfernter Arten gehören. Einen Teil derselben zählt er nicht mehr zur Gattung Rhizoctonia, während er die übrigen vorläufig in 2 Untergattungen trennt: Eurhizoctonia und Moniliopsis, zu welch letzterer die 8 vom Verf. beschriebenen Arten, darunter 6 neue, gehören. Für diese ist ein Bestimmungsschlüssel nach morphologischen Gesichtspunkten beigefügt.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Lander, C. A., Spore Formation in Scleroderma lycoperdoides. (Bot. Gazette. Vol. 95. 1933. p. 330—337.)

Das Untersuchungsmaterial stammte aus den Zedernsümpfen in der Nähe des Douglas-Sees, Michigan. Verf. beschreibt Bildung von Basidie und Basidiosporen, die der bei Scleroderma vulgare ähnelt. Ein Unterschied besteht zwischen beiden in den Zentrosomen. Die Bildung der Basidie beginnt mit der Verschmelzung zweier nahe beieinander liegender Kerne in einer Primordie. Es folgen zwei Kernteilungen. Während der Ausbildung der Sterigmen entsteht eine Vakuole, durch die die 4 Kerne an die apikale Seite der Basidie gedrückt werden. Von den Sterigmen gehen 4 feine Plasmastränge zu den Kernen. Unter Gestaltsveränderung wandert dann je 1 Kern in die vorgebildete Spore. Das Verhalten des Kernes bei der Sporenbildung weist Ähnlichkeit mit dem von Hydnangium carneum und Nidularia auf. Skallau (Berlin).

Peyronel, B., Sur quelques formes de "Botrytis" du type "cinerea" produisant un pigment rouge. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 47—50.)

Verf. hat aus verschiedenen Wirtspflanzen mehrere Stämme von Botrytis cinerea isoliert, die einen roten Farbstoff bilden, und den Einfluß der Kohlenstoffquelle auf die Bildung dieses Farbstoffes untersucht. Wenn 2 Kolonien zweier verschiedener Stämme sich im Wachstum näherten, dann war die Farbstoffbildung in der Berührungszone besonders stark, sehr viel starker als bei 2 Kolonien desselben Stammes. Verf. schließt daraus, daß es sich bei dieser verstärkten Farbstoffbildung um eine antagonistische Erscheinung handelt. Bortels (Berlin-Dahlem).

Dickson, H., Studies in Coprinus sphaerosporus. I. The Pairing Behaviour and the Characteristics of various Haploid and Diploid Strains. (Ann. Bot. Vol. 48. 1934. p. 527—547.)

In der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich Verf. mit den Wechselwirkungen zwischen haploiden und diploiden Stämmen eines Pilzes aufeinander, auch mit dem Einfluß der Röntgenbestrahlung auf die „Saltation". Das den Pilz liefernde Material stammte von Lehmziegeln der Lahun-Pyramide aus der Nähe von Fayum. Als Verf. diese Ziegel mit Wasser tränkte, beobachtete er nach wenigen Tagen die Entwicklung eines Myzels und nach 14 Tagen etwa die Bildung eines Fruchtkorpers vom Typus Coprinus. Auf Grund der vorhandenen Merkmale, die an anderer Stelle veröffentlicht werden sollen, glaubt er, daß eine neue Spezies vorliegt, die er als C. sphaerosporus bezeichnet. Die Sporen des erhaltenen Fruchtkorpers wurden auf einem Malzagar ausgesät und entwickelten sich zu diploiden Kolonien, dem Stamm A. Seine Basidiosporen lieferten haploide Myzelien, von denen Verf. 30 untersuchte. Bei der Aufzucht auf einem Pferdedung-Extrakt-Agar konnten 2 Gruppen unterschieden werden: eine mit einem reichlich entwickelten dünnfädigen Myzel, eine andere mit spärlich entwickeltem Luftmyzel. Beim Paaren der haploiden Stämme untereinander konnten 5 verschiedene Gruppen festgestellt werden mit folgenden Merkmalen: 1. Gruppe: vollkommene Fruktifikation, langer Stiel, ausgebreiteter Hut, zahlreiche schwarze Sporen; 2. Gruppe: Fruchtform mit langem Stiel und ausgebreitetem Hut, aber mit nur sehr wenigen oder gar keinen Sporen; 3. Gruppe: Fruchtkörper mit langem Stiel und ungeöffnetem Hut (gewöhnlich sehr klein); 4. Gruppe: Fruchtform stiellos, Hut ungeöffnet; 5. Gruppe: überhaupt keine Fruchtform vorhanden. Die 30 verschiedenen Haplonten wiesen in morphologischer wie auch physiologischer Hinsicht beträchtliche Abweichungen voneinander auf, im Gegensatz zu den diploiden Kolonien, bei deren Paarung untereinander immer gleiche Ergebnisse erzielt wurden. Diejenigen Diplonten jedoch, die durch Paarung von 2 Haplonten hervorgegangen waren, zeigten nur in einigen Fällen vollkommene Fruchtformen, in der Mehrzahl jedoch unvollkommene, manchmal auch gar keine. Während Verf. bei unbestrahltem Material nur bei den Haplonten einige „Saltanten" beobachtete, nicht bei den Diplonten, traten sie nach der Bestrahlung sehr zahlreich in fast allen Kolonien auf, sie unterschieden sich, was Zahl, Gestalt, Lage, äußere Merkmale usw. anbelangt, sehr weit voneinander. Diese Eigenschaften jedoch sind nicht erblich. Verf. paarte auch noch haploide Formen mit diploiden, wobei er 2 Wachstumsformen beobachtete.

Skallau (Berlin).

Chester, S. K., Specific quantitative neutralization of the viruses of tobacco mosaic, tobacco ring spot,

and cucumber mosaic by immune sera. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1180.)

Wenn man Serum von Ratten, die mit dem Preßsaft mosaikkranker Tabakpflanzen vorbehandelt worden waren, mit ebensolchem Saft mischt, so wird eine Verminderung der Infektionskraft des Saftes beobachtet. Diese Verminderung ist verschiedenartig bedingt. Es handelt sich dabei erstens um eine Störung des Infektionsvorgangs — durch die unspezifische Wirkung des Serums auf die Wirtspflanze —, wie eine solche auch durch andere Proteinsubstanzen (Milch, Ovalbumin, normales Serum) verursacht wird. Zum anderen, weit überwiegenden Teil handelt es sich um eine Neutralisierung des Virus selbst, die bei geeigneter Versuchsanstellung leicht zu einer vollständigen gestaltet werden kann (wie übrigens schon Silberschmidt nachgewiesen hatte). Der Vorgang ist quantitativ und streng spezifisch, was an drei verschiedenen, auf dem Tabak leicht kultivierbaren Vira, nämlich dem Tabakmosaik-, dem Ring spot- und dem Gurkenmosaikvirus gezeigt wurde. So wirkt beispielsweise Ringspot-Immunserum nur auf Ringspot-Virus neutralisierend, nicht im geringsten jedoch auf Tabakmosaik- oder Gurkenmosaikvirus. Die Differenzierung der genannten Vira ist daher auf serologischem Wege einwandfrei möglich. Keine spezifischen Unterschiede waren hingegen zwischen den einzelnen Stämmen desselben Virus nachweisbar, wiewohl diese Stämme symptomatisch z. T. sehr deutlich verschieden waren. Köhler (Berlin-Dahlem).

Stanley, W. M., Chemical studies on the virus of tobacco mosaic. II. The proteolytic action of pepsin. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1269.)

Die Infektiosität des Tabakmosaikvirus einschließlich verschiedener seiner Varianten (Aucuba, Yellow und Masced strain) wird durch Pepsin im Bereich zwischen ph 3 und ph 8 nicht merklich geschwächt. Sehr schnell wird hingegen das Virus bei 37° und ph 3 inaktiviert, während bei — 15° und ph 3 auch bei längerem Stehenlassen keine Wirkung zu erkennen ist. Das Pepsin greift das Virus also offenbar nur unter Bedingungen an, unter denen es seine proteolytische Aktivität entfalten kann. Da außerdem die Virusinaktivierung von der Konzentration an aktivem Pepsin direkt abhängig ist, folgert Verf., daß sie der proteolytischen Tätigkeit des Pepsins zuzuschreiben sei. Wenn dem so ist, so sei weiter anzunehmen, daß das Virus ein Protein oder einen proteinähnlichen Körper vorstelle, der der Hydrolyse durch Pepsin unterworfen werden könne.

Köhler (Berlin-Dahlem).

Rosenvinge, L. K., En Hexering i Jaegersborg Dyrehave. (Bot. Tidskr. Bd. 42. 1934. p. 217—231.)

Verf. beobachtete von 1918 bis 1926 einen Hexenring, der in einer Wiese stand. Er wurde von Clitocybe gigantea mit einem anfänglichen Durchmesser von 17—19 m gebildet. Der durchschnittliche jährliche Zonenzuwachs betrug 75 cm. Seinen größten Durchmesser erreichte er 1923 mit 28 m. Verf. schätzt das Alter dieses Ringes bei seinem Verschwinden 1926 auf 21 Jahre. An der Innen- und Außenseite war eine dunkler gefärbte Graszone zu beobachten. Das erste Auftreten der Sporophore im Frühjahr lag in der Zeit von Ende April bis Anfang Juni. Verf. nahm auch Bodenproben in regelmäßigen örtlichen und zeitlichen Abständen sowohl aus dem Totenring wie aus der Nachbarschaft und verfolgte das Wachstum des Myzels.

An den Außenseiten der Proben trat dieses als weißes, dichtes Flechtwerk auf. Im gewachsenen Boden war das Myzel im Frühjahr bis zu 80 cm außerhalb des vorjährigen Ringes gewachsen, innerhalb und in einer äußeren Zone von 1—6 m fehlte es. Im Winter ging es tiefer in den Boden, 20 cm und mehr. Hyphenfusionen zu „Ösen" wurden gefunden, außerdem kleine Köpfchen mit Basidien, in denen 4 längliche Sporen saßen. Der Säuregrad des Bodens im Ring wies durchschnittlich Werte von ph = 4,6—5,6 auf, außerhalb Werte von 5,6—6,9. Der Ring ist während der Beobachtungszeit nie ganz geschlossen gewesen. Skallau (Berlin).

Sakamura, T., Ammonio- und Nitratophilie bei Aspergillus oryzae im besonderen Zusammenhang mit Schwermetallen. (Journ. Fac. Sci. Hokk. Imp. Univ. Ser. V. Vol. 3. 1934. p. 121—138.)

Verf. wollte mit seinen Untersuchungen weitere Aufklärung des Problems der Ammonio- bzw. Nitratophilie bei Aspergillus oryzae schaffen. Es wurden zwei verschiedene NH_4NO_3-Präparate verwandt: Kahlbaum und Merck. Bei Verwendung von Kahlbaums Nitrat fand gutes Wachstum statt, innerhalb 4 Tage Verdoppelung der Trockensubstanz, bei Anwendung des Merckschen Salzes wuchs der Pilz nicht so gut. Am deutlichsten spiegelte sich das Verhalten des Pilzes in dem verschiedenen ph-Wert der betr. Nährlösungen wider: war das Nitrat Kahlbaums in der Lösung, so fand eine anfängliche Zunahme der Wasserstoffionenkonzentration statt, die jedoch bald wieder abnahm. Im Gegensatz dazu fand in der Kulturlösung mit Merckschem Salz eine dauernde Zunahme der H-Ionen statt, der ph-Wert sank bis auf 2,2—2,4. Auch gleiche Präparate derselben Firma riefen verschiedenes Wachstum hervor. Zu den mit Merckscher Kohle gereinigten Lösungen wurden geringe Fe- und Cu-Zusätze gegeben. Beide zusammen bewirkten Steigerung der H-Ionenkonzentration während des Wachstums (ph-Wert bis zu 2,1). Alleinige Fe-Beigabe rief Sinken hervor, außerdem nahm der ökonomische Koeffizient ab. Für die Ammoniophilie sind also beide Schwermetalle gemeinsam verantwortlich zu machen — geeignetes Verhältnis von Fe : Cu vorausgesetzt —, Fe allein fördert nur die Aufnahme von Nitrat bei NH_4NO_3, während Cu allein eine Mittelstellung zwischen Fe + Cu und Fe einnimmt. Bei ausschließlicher NH_4NO_3-Gabe als N-Quelle erfolgte die NO_3-Aufnahme nur gezwungen unter dem Einfluß von Fe und auf Kosten der C-Verbindungen. Aus seinen Versuchen schließt Verf., daß er berechtigt ist, von Ammoniophilie im strengen Sinne zu sprechen, dagegen nicht von Nitratophilie. Stammeigenschaften und Vorkultur sind — wie schon früher gefunden — für die Aufnahme von NH_3 und NO_3 mitbestimmend. Bei entsprechender Beachtung beider kann die Ammoniophilie durch Konidien vererbt werden.

Skallau (Berlin).

Yoshimura, F., Spherical Cell Formation in Aspergillus oryzae with special Reference to Heavy Metal Impurities in Culture Solution. (Journ. Fac. Sci. Hokk. Imp. Univ. Ser. V. Vol. 3. 1934. p. 89—99.)

Die vorliegende Arbeit soll weitere Beweise zu den schon früher vom Verf. gehegten Vermutungen bzw. Erfahrungen liefern, nämlich, daß Spuren von Schwermetallsalzen die Kugelzellbildung von Aspergillus oryzae und Asp. niger auslösen. Bei den Versuchen wurde festgestellt, daß

zwei gleiche chemische Präparate, z. B. $MgSO_4 + 7$ aq, aber einmal von Merck, dann von Kahlbaum, beide mit Garantieschein, doch ganz verschiedenes Wachstum bei Asp. oryzae hervorriefen. Bei Verwendung des Merckschen Salzes trat beträchtliche Kugelzellbildung ein, das Myzel wuchs zerstreut oder in Form eines Netzwerkes, Konidien fehlten. Im Gegensatz dazu erhielt Verf. bei Kahlbaums $MgSO_4$ kräftige Konidien, kaum Kugelzellbildung, das Myzel als gleichförmiges Flechtwerk. Die Farbe der Konidien war im einen Falle gelb, im anderen dunkelgrün. Das Präparat Kahlbaum enthielt Mn, bei Zugabe von Mn-Salz zur Kultur mit Merckschem Salz wurde der gleiche Habitus wie beim Kahlbaum-Salz erhalten. Sogar die Trockensubstanz erreichte den gleichen Wert. In ähnlicher Weise wirkte Fe, das, obschon in Mercks Salz vorhanden, hier noch zugegeben wurde. Die Verunreinigungen wurden aus den Lösungen mit Merckscher Kohle (für med. Zwecke) entfernt nach den Verfahren von Roberg und Lohmann. Verf. konnte an solchen fast Schwermetallsalz-freien Lösungen zeigen, daß keine Kugelzellbildung eintrat, erst bei Zugabe von Spuren von Cu-, Zn-, Cd-, Ni-Salzen trat diese ein. Bei Verwendung von Agarkulturen konnte Verf. zeigen, daß Fe und Cu für die Konidienbildung erforderlich sind, wie dies für Asp. niger bekannt ist. Cu erwies sich auch hier als bestimmend für die Farbe der Konidien. Fe oder Cu allein stimulieren nur das Myzelwachstum, beide zusammen sind für die Konidienbildung nötig. Skallau (Berlin).

Kaufmann, F., Studies on the Germination of the Spores of certain Basidiomycetae. (Bot. Gaz. Vol. 98. 1934. p. 282—297.)

Durch eine Reihe von Vers. wollte Verf. den Einfluß verschiedener Ernährungsbedingungen, der Wasserstoffionenkonzentration, von Temperatur und anderen Faktoren auf die Keimung der Sporen von Vertretern der Agaricaceen, Nidulariaceen und Lycoperdaceen feststellen. Von den 19 ausgewählten Kulturlösungen erwiesen sich für Coprinus micaceus Rinderbouillon und 4 proz. Zuckerlösung, für C. comatus 0,5 proz. Glyzerinlösung als sehr geeignet. In diesen 3 Nährlösungen wurden die H-Ionenkonzentrationen von ph = 3 bis zu 10 variiert. Die beiden angeführten Coprinus-Arten keimten in diesem ganzen Bereich. Im allgemeinen lag jedoch der Keimbereich zwischen 5 und 8,5 für die übrigen angewandten Arten, wobei die einzelnen Arten innerhalb einer Gattung in ihrer Abhängigkeit stark schwankten. Bei Cyathus olla z. B. lag der mögliche Keimbereich zwischen 6 und 8,5. Ebenso verschieden ist der optimale Bereich, für Lepiota cepaestipes liegt er bei 7, für Armillaria mollea bei 6,5 und für Cyathus olla bei 8. Die Coprinus-Arten keimen besser in einem alkalischen Medium. Die günstigste H-Ionenkonzentration für das Wachstum liegt etwas unterhalb des optimalen Keimungswertes. Der Einfluß der Temperatur wurde für die Agaricaceen und Nidulariaceen in einem Bereich von 0—45° untersucht. Die optimale Temperatur liegt um 30° herum und ist für die einzelnen Arten wiederum etwas verschieden. — Sämtliche Keimversuche mit Sporen von Pilzen aus der Gruppe der Lycoperdaceen: Bovistella radicata und Calvatia cyathiformis schlugen fehl, trotzdem Verf. 25 verschiedene Kulturlösungen zur Anwendung brachte. Die umständliche Keimmethode von Swartz, die auf die „natürlichen“ Bedingungen eingeht, und wonach die Sporen

abwechselnd höheren und tieferen Temperaturen ausgesetzt werden, versagte. Da das Versagen auch an einer evtl. vorhandenen Impermeabilität der Sporen für die Nährlösungen liegen konnte, setzte Verf. sie verschiedenen osmotischen Drucken aus, der Temperatur der flüssigen Luft wie auch der des siedenden Wasserdampfes, er ließ Enzyme und Anästhetika einwirken, fernerhin kombinierte er diese verschiedenen Behandlungsmethoden miteinander, jedoch alles ohne Erfolg. Skallau (Berlin).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Kajakowa, N., Differenzierung lebendiger und toter Bakterien und die Methodik der direkten Zählung bei Untersuchung von Nahrungsmitteln. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 110—119.) [Russisch.]

Bei der Kontrolle der Nahrungsmittelbereitung gibt direkte mikroskopische Zählung der Mikroorganismen zuverlässigere Ergebnisse als die Methode von Koch. Der wesentliche Mangel der direkten Zählungsmethode, die gleichzeitige Zählung lebendiger und toter Mikroorganismen, läßt sich durch folgende Methodik beseitigen. 2 Tropfen des zu untersuchenden Materials werden mit 2 Tropfen steriler Bouillon und 1 Tropfen 0,2% wässeriger Methylviolett-Lösung gemischt. Auf den Präparaten wird mittels des Okularnetzes das Prozentverhältnis zwischen den toten (gefärbten) und den lebendigen Bakterien festgestellt. Bei Sterilisation der Nahrungsmittel getötete Bakterien färben sich gleichfalls. In die Kultur von Fäulnisbakterien gesetzte tote Bakterien und Hefezellen lassen sich in derselben noch nach 3 Monaten durch Färbung feststellen. Die Zellen der Mikroorganismen verfallen folglich sehr langsam der Zerstörung.

A. Imšenecki (Leningrad).

Bahrs, J., Beitrag zur Kenntnis des Entstehens von Milchfehlern. I. Die Entwicklung der Bakterienflora in „Schlempemilch“ unter Berücksichtigung der Pufferung der Milch. II. Die Abhängigkeit des Wachstums einiger alkalibildender Organismen von der Wasserstoffionenkonzentration. Diss. Univ. Kiel. 1933.

Zu I. Die gelegentlich von Fütterungsversuchen der Molkereilehranstalt Münster herrührende Milch wurde auf folgendes geprüft: Allgemeiner Keimgehalt auf Milchzucker = F. P.-Agar, Säurebildner : Nichtsäurebildnerverhältnis auf Chinablau-Laktose-Agar, Pilz- und Hefekeimzahl auf Würzeagar, Federstrichkultur (in Bouillon mit und ohne Laktose, in Peptonwasser und Würze). Die Bestimmungen wurden mit der frischen Milch und 2—4 Tage später nach Aufbewahrung bei 4—6° C durchgeführt. Zur Nachprüfung der seinerzeit von Richter festgestellten „Überpufferung“ der Milch wurden die Wasserstoffzahl und die Pufferung elektrometrisch bestimmt und zur Ergänzung auch Aschenanalysen angefertigt. Mit der Menge der (Roggen-) Schlempe und des Beifutters (Weizenkleie) war auch die Einwirkung auf die Milch eine wechselnde. Die Weizenkleie vermochte sowohl die Aschenzusammensetzung einschließlich der Pufferung sowie die aufkommende Bakterienflora günstig zu beeinflussen. Weitere Versuche mit konstanter Schlempemenge, aber wechselndem Beifutter (Grünfutter und Kraftfutter, mit und ohne Weizenkleie) bestätigten dieses Ergebnis und zeigten, daß sowohl das Grünfutter, wie insbesondere die Weizenkleie einen

günstigen Einfluß auf die Zusammensetzung der Milch ausübt (Rückgang der Überpufferung, normale Aschenzusammensetzung, Verschwinden des ölig-bitteren Geschmackes und Eintreten normaler Säuerung durch Milchsäurebakterien).

Zu II. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Schwierigkeiten, die für die Entwicklung der Milchsäurebakterien bei Überpufferung im Bereich des ersten Säurezusatzes bestehen, dem Wachstum der alkalibildenden Bakterien Vorschub leisten. Als Puffersystem wurde für die Versuche das Phosphatgemisch nach Sörensen in Hefewasser ohne Zucker angewendet, als Versuchsstämme kamen folgende Typen zur Untersuchung: Stamm 1 gehörte zur Alkaligenes-Gruppe, Stamm 2 zur Cloacae-Gruppe, Stamm 3 zu den Mikrokokken und Stamm 4 zu der Fluorescens-Gruppe. Miteingeschlossen wurde ein Aerogenes-Stamm. Es zeigte sich, daß bei allen das Wachstum mehr oder weniger stark von der Wasserstoffionenkonzentration abhängig war, insbesondere war der Spielraum nach der sauren Seite verhältnismäßig gering: unterhalb ph 6,0 zeigte sich nur mehr sehr geringes oder überhaupt kein Wachstum. Mit Ausnahme des besonders Alkali liebenden Cloacae-Vertreters befand sich das Wachstumsoptimum um den Neutralpunkt herum. Ist also die Milch überpuffert, dann haben die Alkalibildner infolge der Konstanz der Wasserstoffionenkonzentration genügend Zeit, sich anzureichern und den Milchsäurebakterien ihren natürlichen Vorrang streitig zu machen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Frayer, J. M., The production of high quality milk. IV. The influence of delayed cooling, combined with other cooling practices, upon the quality of milk. (Vermont Agr. Exp. Sta. 1932. Bull. 343.)

Verf. tadelt einleitend die unbestimmte Art und Weise, wie in den amtlichen Verlautbarungen von „geeignetem“ oder „angemessenem“ Kühlen gesprochen wird, während in keiner Vorschrift irgendwie zu finden ist, worin eigentlich, genau gesagt, ein vorschriftsmäßiges Kühlen besteht. Von ganz besonderer Wichtigkeit ist diese Frage in solchen Gegenden, in denen, wie in Vermont, die Milch länger aufbewahrt oder auf größere Strecken transportiert wird. Die umfangreichen und gründlichen Untersuchungen wurden mit Milchen verschiedenster Qualität durchgeführt, wobei dem Einfluß verzögerter Kühlung auf Keimgehalt und Haltbarkeit der Milch ganz besondere Beachtung geschenkt wurde. Ergebnisse: Kühlen der Milch unmittelbar nach dem Melken auf 10° hat gute und nachhaltige Wirkung. Bei Morgenmilch genügen sogar 15,5° C, während allerdings bei Abendmilch diese Temperatur als ungenügend anzusprechen ist. Genau so schlimm wirkt es sich aus, wenn eine Milch wieder warm wird, nachdem sie schon einmal auf 4,4° und tiefer herabgekühlt worden war. Die besten Erfolge werden erzielt, wenn die Milch unmittelbar auf 4,4° C gekühlt und bei dieser Temperatur gehalten wird. Frischmilch, die überhaupt keiner Kühlung unterworfen wird, büßt schrittweise mit jeder Stunde an Qualität und Haltbarkeit ein und hat keinerlei Aussicht, dem geforderten bakteriologischen Standard zu genügen.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Frayer, J. M., Influence of temperature on bacterial growth in pure culture and in mixed flora of milk. (Vermont Agr. Exp. Sta. 1934. Bull. 377.)

23 Reinkulturen verschiedenster, aus Milch isolierter Bakterien zeigten bei einer Temperatur von 24° C ganz unterschiedliche Wachstumsintensität in Milch. Nach 2 Std. betrug die durchschnittliche Keimzunahme 22%, nach 4 Std. 221%, nach 6 Std. 1230% und nach 8 Std. 6229%. Nach Kühlen der Milch auf 4,4° C und 24 stünd. Aufbewahrung bei dieser Temperatur zeigte sich meist eine Reduktion des Keimgehalts und zwar durchschnittlich um 16% bei den sofort nach Beimpfung gekühlten Proben, um 14% bei den nach 2 Std. gekühlten, um 16% bei den nach 6 Std. gekühlten und um 13% bei den nach 8 Std. gekühlten. Entweder greift die niedrige Aufbewahrungstemperatur in ein gewisses Wachstumsstadium der Bakterienpopulation störend ein oder es mag auch eine andauernde bakterizide Wirkung vorliegen. Bei allgemein empfänglichen Organismen kann auch die Wirkung der tiefen Temperatur als solcher zerstörend wirken. Die Mischkulturen verhielten sich in Milch keineswegs einheitlich; manche wuchsen rascher als jede Einzelkultur für sich, manche nahmen eine Mittelstellung ein und manche wuchsen zusammen viel langsamer als in Einzelkultur.

K. J. Demeter (Munchen-Weihenstephan).

Crabtree, J. A., and Litterer, W., Outbreak of milk poisoning due to a toxin-producing staphylococcus found in the udders of two cows. (Amer. Journ. of Publ. Health. Vol. 24. 1934. p. 1116—1122.)

An einer Schule mit Internatsbetrieb im Staate Tennessee wurden in kurzen Zeitabständen 7 Epidemien beobachtet, die sich bald nach Einnahme des Frühstücks durch Schwindel, Erbrechen, unter Umständen auch durch schwere Ohnmacht äußerten. Weitere Unterleibsstörungen traten nicht ein, auch kein Fieber; im weiteren wurde nach der Magenentleerung der normale Gesundheitszustand rasch wieder hergestellt. Die bakteriologische Untersuchung und der epidemiologische Augenschein ergab, daß als Ursache nur die genossene Milch in Betracht kommen konnte. Die aus der Milch, dem Erbrochenen und einigen Rachenabstrichen isolierten hämolytischen Staphylokokken (vom Aureus- und Albus-Typ) waren identisch mit solchen aus den Eutern von 2 Kühen, die die Schule mit Milch versorgten. Nach Feststellung des Tierarztes hatten diese chronische Mastitis, wahrscheinlich befanden sich in diesen Eutern auch Staphylokokkenherde, die zu gewissen Zeiten die Milch mit diesen Organismen überschwemmten und so zu den Epidemien Veranlassung gaben. Das Toxin konnte aus den Kulturen durch Filtration gewonnen und damit bei Versuchspersonen die gleiche Krankheitserscheinung, zwar weniger schwer, aber rascher eintretend, auf experimentellem Wege hervorgerufen werden.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Smith, F. R., and J. L. Henderson, E. Coli in mastitis, with accompanying changes in milk composition. (Journ. of Dairy Sci. Vol. 17. 1934. p. 799—803.)

Mastitisfälle mit Bact. coli als Ursache sind in der Literatur schon öfters beschrieben worden. Hier handelt es sich um eine Kuh, deren Milchleistung plötzlich innerhalb 12 Std. um rund 90% sank, während gleichzeitig das rechte Hinterviertel hart geschwollen, heiß und schmerzempfindlich war. Die bakteriologisch-mikroskopische Untersuchung der daraus erhaltenen Milch zeigte eine Reinkultur von Stäbchenformen. Die Isolierung (durch serienweise Verdünnung in Lackmusmilch und Verarbeiten auf Standard-Blut- und Eosin-Methylenblauagar) und biologische Prüfung (Säure-

und Gasbestimmung in Milch und aus Glukose und Laktose, Methylrotprobe, Indolbildung, Gelatineverflüssigung) ergab einen Toxin bildenden Stamm von Bact. coli. Die gleichzeitig durchgeführten Bestimmungen des ph sowie des Chlorzuckergehaltes der Milch ergaben Anzeichen, wie man sie bei einer latenten chronischen Mastitis zu finden gewohnt ist.

K. J. Demeter (München-Weihenstephan).

Sedych, A., Beitrag zum Verhalten gewöhnlicher, verbreiteter Mikroorganismen gegenüber Fetten. Bull. of the State Inst. of Agric. Microbiol. USSR. T. 5. 1933. p. 299—313.) [Russ. m. dtsch. Zusfassg.]

Verf. stellt fest, daß viele der von ihm untersuchten Mikroorganismen (Bact. fluorescens liquefaciens, Bact. coli comm., Bact. prodigiosum, Bac. subtilis, Bact. mesentericum, Bact. proteus, Bact. punctatum, Sarcinen, hefeartige Mikroorganismen, Oidium lactis u. a.) imstande sind, Fette zu zersetzen. Dabei kommt es zur Anhäufung von Aldehyden und freien Säuren sowohl im Fettrest als auch in den wässerigen Lösungen. Diese Verbindungen können dann weiteren Veränderungen unterliegen. In flüssigen Kulturen von Bact. fluorescens liquefaciens und Oidium lactis wurden nach einiger Zeit neben weißem Fett gelbe, flüssige Massen beobachtet, die eine erhöhte Jodzahl aufwiesen.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Becker, S., Einfluß der Autokonservierung des Weizens auf seine Mikroflora. (Journ. Bot. de l'URSS. T. 19. No. 2. 1934. p. 126—140.) [Russisch.]

Zu Beginn des Experimentes enthielt der Weizen bei 11% Feuchtigkeit 640 Pilze und 2600 Bakterien auf 1 g. In hermetisch geschlossenen Gefäßen aufbewahrter Weizen von 16,4—23% Feuchtigkeit wies bedeutend weniger Mikroorganismen auf. 5 Monate in offenem Gefäß aufbewahrter Weizen (Feuchtigkeit 23%) enthielt z. B. 6210 Millionen Bakterien und Pilze auf 1 g, während in geschlossenem Gefäß aufbewahrter Weizen 2000 enthielt. Was den qualitativen Bestand der Mikroflora betrifft, so sind in luftdurchlässigen Gefäßen verschiedene Aspergillus- und Penicillium-Arten vorherrschend, und zwar Penicillium, insbesondere bei höheren Feuchtigkeitsgraden. In geschlossenen Gefäßen werden nur Oospora variabilis und Micrococcus pyogenes gefunden, seltener Cladosporium sp. und Pilz 19 (mycelia sterilia). Diese Autokonservierungsmethode ermöglicht die Aufbewahrung des Getreides bei einer Feuchtigkeit bis 20% und 15—20° C, während eines halben Jahres.

A. Imšenecki (Leningrad).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Pethybridge, G. H., Marsh spot in pea seeds. (Journ. of the Ministry of Agric. Vol. 41. 1934. p. 833—849, 7 figs.)

Die in England als „Marsh spot", in Holland als „kwaad hart", „kwade pitten" oder „zwarte pitten" bezeichnete Krankheit der Erbse äußert sich darin, daß größere Teile des Gewebes der Kotyledonen, manchmal auch der Plumula, abgestorben sind. Verf. konnte ebenfalls einen Erreger nicht feststellen. Er nimmt an, daß die Krankheit auf ungünstige Bodenverhältnisse zurückzuführen ist. Der genaue Zeitpunkt, wann die Flecke am Samen

entstehen, konnte noch nicht ermittelt werden. Ein Einfluß auf die Keimfähigkeit war nur dann zu beobachten, wenn die Flecke sehr groß waren. Die Sämlinge aus kranken Samen werden oft mehr oder weniger in ihrer Entwicklung gehemmt. Die Krankheit wird nicht durch den Samen übertragen.
Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Overbeek, J. van, Die Symptome des Bormangels bei Zea Mays. (Meded. van het Phyt. Lab. Willie Commelin Scholten. H. 13. 1934. S. 29—32.)

Verf. untersuchte Pflanzen von Zea mais in Gläsern mit van de Crone-Lösung mit und ohne Borzusatz. Es zeigte sich, daß ohne Bor die neugebildeten Blätter länglichweiße, durchscheinende Streifen zeigten, welche für die Krankheit charakteristisch sind. Optimales Wachstum findet statt bei einem Zusatz von 1,0 mg Borsäure pro l. Da die jungen Pflänzchen mit weniger Bor vorlieb nehmen, schließlich aber Anzeichen von Bormangel aufweisen, konnte daraus geschlossen werden, daß das Borbedürfnis mit dem Wachstum der Pflanzen zunimmt.
van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Schreven, D. A. van, Kalkgebrek als oorzaak van mergnecrose bij aardappelknollen. [Kalkmangel als Ursache der Marknekrose bei Kartoffelknollen.] (Tijdschr. over Plantenz. Heft 2. 1934. S. 226—249, m. 3 Taf.)

Schon Quanjer unterschied 3 Arten von Nekrose bei äußerlich gesund aussehenden Kartoffelknollen: 1. „Kringerigheid" (Korkringigkeit oder Pfropfenbildung), beim Durchschneiden der Knollen sich äußernd in nekrotischen, oft konzentrischen Kreisen. 2. „Pseudonecrose" (erbliche Eisenfleckigkeit), wobei nekrotische Flecke sowohl innerhalb als außerhalb des Leitbündelringes auftreten. 3. „Mergnecrose" (Marknekrose), wobei die Flecken gewöhnlich innerhalb des Leitbündelringes im Parenchym auftreten.

Letzgenannte Krankheit, welche Verf. näher studierte, wurde schon 1926 von Beatrice Schwarz aus Holländisch-Indien erwähnt unter dem Namen „Roestvlekkenziekte" (Rostfleckenkrankheit). In Deutschland werden obengenannte Krankheiten oft miteinander verwechselt und unter dem Namen Eisenfleckigkeit zusammengefaßt. Da die „Pseudonetnecrose" nicht abhängig ist vom Kalkgehalt des Bodens, wurde die Marknekrose ebenfalls daraufhin untersucht und zwar sowohl in Wasser-, wie in Glassandkulturen. Es hat sich dabei herausgestellt, daß in der Tat Kalkmangel die Ursache der Marknekrose ist. Jedoch darf die Krankheit nicht mit der „Hooghalensche ziekte" verwechselt werden, welche auch durch Kalkdüngung bekämpft wird. Hier sind es nämlich die unteren Blätter, welche die ersten Krankheitsmerkmale zeigen, im Gegensatz zur Marknekrose, wo die Gipfel der Pflanzen zuerst befallen werden. In ihrem Wesen sind die Krankheiten ganz verschieden: bei der „Hooghalensche" Krankheit ist es der Boden, der einen Mangel an Basen aufweist, bei der Marknekrose ist es die Pflanze, welche an Kalkmangel leidet.

Schließlich wurde vom Verf. untersucht, in welchem Maße Mg-Ionen an der Krankheit beteiligt sind.
van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Abgeschlossen am 26. April 1935.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 92. No. 8/12.
Ausgegeben am 24. Juni 1935.

Nachdruck verboten.

Zum Problem der erworbenen Immunität bei Pflanzen.

Vakzination der Bohnen gegen den Pilz Toile.

[Aus dem Laboratorium für Pflanzenimmunität des Mikrobiologischen Forschungsinstituts (Direktor: A. Kaliaew) der Moskauer Universität und dem Lehrstuhl für Phytopathologie ebenda (Vorsteher: Prof. L. Kursanow)].

Von **A. Kaliaew, A. Krawtschenko** und **N. Smirnowa.**

Die Arbeit von Carbone und Kaliaew zeigte, daß es gelingt, durch Vakzination der Bohnen gegen den Pilz Toile eine gewisse Immunität gegen eine nachfolgende Infektion mit diesem Pilz zu erlangen.

Der Zweck der erwähnten Arbeit war, die immunisierenden Eigenschaften der auf verschiedene Weise aus dem Pilze Toile gewonnenen Vakzine zu klären.

Mit Vakzinen aus Botrytis cinerea haben auch andere Autoren gearbeitet. Im Jahre 1901 vakzinierte Beauverie junge Begonien mit einer abgeschwächten Kultur von Botrytis cinerea, die bei den Begonien keine Erkrankung hervorrief. Nach Hinzufügung eines vollvirulenten Stammes von Botrytis cinerea zur Erde, in der die vakzinierten Begonien wuchsen, gingen die Begonien nicht zugrunde, während die nichtvakzinierten Exemplare durch diesen Stamm vernichtet wurden. Im Jahre 1928 immunisierte Nobecourt Bohnen gegen diesen Pilz, indem er die in steriler Erde befindlichen Samen mit einer Flüssigkeit aus der Kultur von Botrytis cinerea begoß. Nach Beendigung der Vakzination wurden die Bohnen nach 10 Tagen in andere Erde überpflanzt und durch Einstich mit dem obenerwähnten Pilz infiziert.

Nach 1—2 Tagen erkrankten die vakzinierten sowie auch die Kontrollpflanzen (nicht vakzinierten). Nach 20 Tagen erholten sich die vakzinierten Pflanzen, während die nicht vakzinierten Kontrollexemplare schwer erkrankten und starke Gewebeschädigungen zeigten.

Jarach zeigte in einer Arbeit über den Mechanismus der erworbenen Immunität bei Pflanzen, daß man mit demselben Pilz eine Immunisierung der Bohne durch Vakzination erzielen kann.

Da die Möglichkeit einer erworbenen Immunität bei Pflanzen noch umstritten und die Methodik der Pflanzenimmunisierung noch nicht genügend ausgearbeitet ist, so haben wir uns vorgenommen, die Versuche von Carbone und Kaliaew, Beauverie, Jarach und anderen an einem größeren Material experimentell zu wiederholen und dabei die Flüssigkeit von einer einmonatigen Kultur des Pilzes auf Malzbouillon anzuwenden, die zuvor durch ein Bakterienfilter geschickt wird. Mit der Frage anderer Herstellungsmethoden der Vakzine wollen wir uns vorerst nicht beschäftigen.

Als Untersuchungsobjekt benutzten wir verschiedene Bohnensorten: zur Herstellung der Vakzine und zur Infektion wählten wir denselben Pilz, mit dem die obenerwähnten Autoren gearbeitet haben, und zwar den Pilz Toile, der schon im Jahre 1901 von Beauverie gezüchtet wurde.

In unserem ersten Orientierungsversuch bemühten wir uns, den Versuch von Carbone und Kaliaew mit derselben Sorte italienischer Bohnen zu wiederholen, indem wir die Pflanzen mit derselben Vakzine (Bouillon aus einer Kultur des Pilzes Toile) immunisierten, die in Italien im Laboratorium von Prof. D. Carbone (Istituto Sieroterapico Milanese) hergestellt wurde und mit der Carbone und Kaliaew ihre Versuche durchgeführt hatten. Der Versuch wurde folgendermaßen ausgeführt: mit Formalin sterilisierte Samen der Bohnensorte „Fagiolo rampicante per baccelini dei Colli Lario" wurden in sterilem Sand zum Keimen gebracht. Beim Erscheinen der Sproßlinge (nach 4 Tagen) wurden die Samen einmal mit je 1 ccm Vakzine je Bohne begossen (diese Vakzine stellte ein Filtrat einer zweiwöchigen Kultur des Pilzes Toile auf Malzbouillon dar). Die Vakzination dauerte vom 17. Juni bis zum 21. Juni, danach wurden die Pflanzen in Töpfe mit Erde übergepflanzt und am 25. Juni mittels Einstich in der Nähe der Kotyledonen mit dem Myzel des Pilzes Toile infiziert. Die Beobachtung dauerte 9 Tage, die ersten 3 Tage befand sich die Pflanze zur besseren Entwicklung des Pilzmyzels in einer feuchten Kammer. Zur genaueren Dosierung der Pilzmenge pro Bohne wurde das Pilzmyzelium, welches sich auf schrägem Agar in Form eines Häutchens gebildet hatte, vom Agar-Agar abgenommen und in einzelne Stückchen à 2 qmm zerschnitten. Mit diesen Stückchen wurde durch Einstich in der Nähe der Kotyledonen jede Pflanze infiziert.

Im Versuch waren 20 vakzinierte Bohnen und 12 Kontrollpflanzen. Unter 20 vakzinierten Bohnen gingen durch Infektion 5 Stück (25%) zugrunde, unter 12 Kontrollen = 10 Stück (83%). Nach 9 Tagen erholten sich die 15 vakzinierten Bohnen, die erkrankt waren, und die Pflanzen entwickelten sich ganz normal ohne irgendwelche Zeichen einer Depression, während die zurückgebliebenen 2 Kontrollpflanzen eintrockneten[1]), ohne die charakteristische Fäule des Stengels zu zeigen.

Mit diesen orientierenden Versuchen bestätigten wir auch für den Sommer[2]) die Ergebnisse der Versuche von Carbone und Kaliaew unter Benutzung derselben Bohnensorte und der von ihnen angegebenen Vakzine.

Weiterhin stellten wir uns die Aufgabe, die Versuche auch mit russischen Bohnensorten und einer von uns hergestellten Vakzine durchzuführen.

Im orientierenden Versuch Nr. 2 dieser Serie haben wir, den eben beschriebenen Versuch wiederholend, in der Methodik folgende Veränderungen durchgeführt: zum Zweck einer genaueren Dosierung der Vakzine für jede Pflanze wurden die Samen der Bohnensorte „Phönix", die wir aus Kiew erhalten haben, in sterilem Sand vom 22. Sept. bis zum 25. Sept. zum Keimen gebracht und in kleine Gläser (10—15 ccm) mit verdünnter Knopscher Nährlösung übergepflanzt, wo sie vom 25. Sept. bis zum 1. Okt. weiterwuch-

[1]) Die von uns gebrauchte Bezeichnung „eingetrocknet" bedeutet, daß die Pflanzen keine charakteristische Faulnis des Stengels zeigten; derselbe war makroskopisch nicht geschadigt, aber die Blatter der Pflanzen verwelkten allmahlich und die Pflanze ging zugrunde.

[2]) Carbone und Kaliaew haben ihre Versuche während der Wintermonate durchgeführt.

sen; daraufhin wurde in jedes Glas 1 ccm unverdünnten Filtrats der Kultur hinzugefügt.

Wir erhielten somit in den Gläsern eine ungefähr 10 proz. Verdünnung der Vakzine. Die Pflanzen verblieben in den Gläsern mit der Vakzine vom 1. Okt. bis zum 4. Okt., danach wurde die Vakzine weggegossen und durch die vierfach verdünnte K n o p sche Lösung ersetzt; nach 3 Tagen (7. Okt.) wurde die Infektion mit dem Myzel einer dreitägigen Kultur des Pilzes durchgeführt und die Bohnen für 2—3 Tage in eine feuchte Kammer gebracht.

Nach 2—3 Tagen begannen die Pilze sich an allen Pflanzen (vakzinierten und Kontrollen) zu entwickeln, an der Einstichstelle lockere kissenartige Gebilde hervorbringend.

Unter 15 in diesem zweiten orientierenden Versuch vakzinierten Pflanzen ging keine einzige zugrunde; nach 16 Tagen ging eine Pflanze ein — anscheinend durch Eintrocknung. Von 7 Kontrollpflanzen sind innerhalb von 16 Tagen durch die Infektion (Entwicklung einer Fäulnis des Stengels) 6 Pflanzen (85,6%) zugrunde gegangen und eine Pflanze ist eingetrocknet.

Durch die Ergebnisse unserer orientierenden Versuche ermutigt, entschlossen wir uns, die Versuche in größerem Maßstabe durchzuführen, besonders deshalb, weil die in der Literatur vorhandenen Arbeiten meistens an einem kleinen Versuchsmaterial durchgeführt worden sind.

Der Versuch Nr. 3 der folgenden Serie, der an 175 Bohnen durchgeführt wurde, konnte wegen zufälliger Temperaturerhöhung im Luminostat und kalten, trüben Wetters nicht zu Ende geführt werden: die Pflanzen waren etioliert, blieben stark im Wachstum zurück und waren durch die Temperatursteigerung geschädigt. Trotz dieser ungünstigen Umstände gab auch dieser Versuch einige positive Ergebnisse. Unter 106 vakzinierten Bohnen verblieben nach 22 Tagen (10 Tage nach der Temperatursteigerung im Luminostat) 19,8% in unversehrtem Zustand und unter 70 Kontrollbohnen nur 7,1%.

Um trotz dem kalten und trüben Wetter die Etiolisierung unserer Pflanzen zu verhindern, entschlossen wir uns, in den folgenden Versuchen die fehlenden ultravioletten Strahlen der Sonne vom Zeitpunkt der Überpflanzung an in Gefäße bis zum Augenblick der Infektion durch tägliche Bestrahlung mit der B a c h schen Lampe (auf 1 m Abstand 5 Min. lang) zu ersetzen.

Im Versuch Nr. 4 wurden die Samen der Bohnensorte „Goldener Regen" (aus Kiew erhalten) vom 15. Dez. bis zum 19. Dez. auf feuchtem Filtrierpapier bei 18—20° C zum Keimen gebracht; daraufhin wurden sie in Gläser übergepflanzt und nach 2 Tagen (21. Dez.) wurde in jedes Glas je 1 ccm Filtrat einer einmonatigen Kultur des Pilzes Toile auf Malzbouillon hinzugegeben: die Vakzination dauerte 8 Tage (bis zum 29. Dez.), die Flüssigkeit in den Gläsern wurde täglich durchlüftet. Die Pflanzen wurden auch täglich (bis zum 2. Jan. 1933) mit der B a c h schen Lampe bestrahlt. Unter diesen Verhältnissen entwickelten sich die Pflanzen befriedigend. 4 Tage nach Beendigung der Vakzination (2. Jan.) wurden die vakzinierten, sowie die Kontrollpflanzen mittels eines Einstiches mit dem Myzel einer viertägigen Kultur des Pilzes infiziert und für 2—3 Tage in eine feuchte Kammer gebracht. Am zweiten Tag begann der Pilz sich auf den vakzinierten sowie auf den Kontrollpflanzen zu entwickeln. Die Beobachtung wurde 13 Tage lang durchgeführt. Die zugrunde gehenden Pflanzen wurden zwecks

Tab. 1. Vakzination der Bohnen „Goldener Regen".

	Beginn der Vakzination	Ende der Vakzination	Zahl der infiziert. Exempl.	Tag der Infektion	Zahl der Tage von der Infektion bis zum Tode der Pflanzen								Im ganzen zugrunde gegangen	Eingetrocknet	Unversehrt geblieben
					3	3	7	8	9	11	12	13			
Vakzinierte Pflanzen. %	21. 12.	29. 12.	84	2,1	—	6 7,2	7 15,6	5 21,6	4 26,5	3 30,1	4 33,7	4 38	32 38	— —	52 62
Nicht vakzinierte Kontrollpflanzen. %			81	2.1	4 4,9	14 22,2	22 49,3	10 61,7	7 70,3	9 81,5	— —	— —	66 81,5	10 12,3	5 6,2

Tab. 2. Vakzination der Bohne „Mitschinskaja".

	Beginn der Vakzination	Ende der Vakzination	Zahl der infiziert. Exempl.	Tag der Infektion	Zahl der Tage von der Infektion bis zum Tode der Pflanzen							Im ganzen zugrunde gegangen	Eingetrocknet	Unversehrt geblieben
					3	4	5	6	7	8	12			
Vakzinierte Pflanzen. %	14. 2.	22. 2.	58	26. 2.	2 3,3	8 12,2	5 25,8	3 31	8 44,8	3 50	5 58,3	34 58,6	7 12	17 29,4
Nichtvakzinierte Kontrollpflanzen. %	—	—	65	26. 2.	4 6,1	36 61,9	6 70,7	7 81,5	3 86,1	7 96,9	2 100	65 100	— —	— —

Auffindung des Pilzes einer mikroskopischen Kontrolle unterworfen und gewöhnlich wurde der Pilz gefunden (siehe weiter unten).

Der Pilz Toile konnte aus dem inneren Teil des Stengels herausgezüchtet werden, was dafür spricht, daß die Pflanzen durch den von uns im Versuch benutzten Pilz zugrunde gegangen sind. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Aus dieser Tabelle ist zu ersehen, daß nach 13 Tagen von 84 vakzinierten Pflanzen 32 Stück zugrunde gegangen sind (38%) und daß keine einzige eingetrocknet ist: 52 Bohnen (62%) blieben unversehrt und waren nach Überstehen der Infektion vollkommen gesund.

Unter 81 Kontrollpflanzen sind nach 13 Tagen 66 Bohnen (81,5%) zugrunde gegangen, 10 Stück (12.3%) sind eingetrocknet und 5 Pflanzen (6.2%) blieben unversehrt. Man muß auch berücksichtigen, daß der Untergang der Kontrollpflanzen sich viel schneller vollzog als der der vakzinierten. Es war somit bei Belichtung der Pflanzen mit ultravioletten Strahlen, bei normalen Wachstumsbedingungen und bei energischer Aufsaugung der Flüssigkeit aus den Gefäßen (wir mußten im Gegensatz zu den Versuchen Nr. 2—3 öfter die Knopsche Flüssigkeit zugießen) die Vakzination erfolgreich.

Da in den vorigen Versuchen das Wurzelsystem der Bohnen in den kleinen Gläschen (10—15 ccm) zu sehr beengt war, benutzten wir für die weiteren Versuche Kolben mit einem Fassungsvermögen von 25—30 ccm Flüssigkeit.

In den vorigen Versuchen fügten wir zu jedem Glas (10—15 ccm) 1 ccm Vakzine-Filtrat hinzu, so daß wir eine ungefähr 10 proz. Vakzinelösung erhielten. Dieselben Mengeverhältnisse hielten wir auch bei Anwendung der Kolben ein, indem wir bei Benutzung der Kolben zu 25 ccm = 2,5 ccm Vakzine und bei Benutzung der Kolben zu 50 ccm = 5 ccm Vakzine hinzugaben.

Im Versuch Nr. 5 benutzten wir noch eine Bohnensorte, die sogenannte „Mitschinskaja"-Sorte.

Die Samen wurden vom 3. Febr. bis zum 12. Febr. 1933 auf Filtrierpapier zum Keimen gebracht und danach in Kolben mit der Knopschen Lösung (25 ccm) übergesetzt; am 14. Febr. wurden in jeden Kolben je 2,5 ccm unverdünnter Vakzine (Filtrat einer 4 Wochen alten Kultur von Toile) hinzugegeben. Die Bohnen wurden täglich mit der Bachschen Lampe auf 1 m Distanz 5 Min. lang bis zum 20. Febr. bestrahlt. Am 22. Febr. wurden die Pflanzen in eine frische Knopsche Lösung, die keine Vakzine enthielt, übergepflanzt und nach 4 Tagen (26. Febr.) wurden die vakzinierten sowie die Kontrollbohnen auf die übliche Weise mit dem Myzel einer viertägigen Kultur des Pilzes infiziert.

Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengefaßt.

Aus der Tabelle ist nicht nur zu ersehen, daß die Kontrollpflanzen in einem größeren Prozentsatz zugrunde gehen als die vakzinierten, sondern auch, daß das 2—3 mal schneller geschieht. Nach 12 Tagen sind von 65 nichtvakzinierten Kontrollen 100% zugrunde gegangen; zu gleicher Zeit sind unter 58 vakzinierten Pflanzen durch die Infektion 34 zugrunde gegangen (56,6%), 7 eingetrocknet (12%) und 12 unversehrt geblieben (29,4%).

Außer den beschriebenen Versuchen haben wir noch andere Versuche angestellt, die im allgemeinen dasselbe Bild zeigten.

Wenn wir unsere Versuche, auch diejenigen inbegriffen, die wegen

Schädigung des Luminostats nicht gelungen sind, zusammenzählen (Tab. 3), so sehen wir, daß im Durchschnitt die vakzinierten Pflanzen durch die Infektion in 55,1% und die Kontrollpflanzen in 90,2% zugrunde gehen; die nicht zugrunde gegangenen machen unter den vakzinierten 42% aus, unter den Kontrollen = 4%. Diese Ergebnisse zeigen ganz einwandfrei, daß bei Bohnen eine Immunität erworben werden kann.

Tab. 3. Vakzinierung verschiedener Bohnensorten gegen Pilz Toile[1]).

	Zahl der Exemplare	Davon zugrunde gegangen nach der Infizierung				unversehrt geblieben	
		durch Infektion		eingetrocknet			
		Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
Vakzinierte Pflanzen . .	283 (177)	156 (71)	55,1 (40,1)	8	2,8 (4,6)	119 (98)	42,2 (55,3)
Nicht vakzinierte Kontrollpflanzen.	235 (165)	212 (14)	90,2 (89,1)	13	5,5 (7,8)	10 (5)	4,3 (3)

[1]) Aus Objektivitätsgründen haben wir in die zusammenfassende Tabelle auch die Ergebnisse des nicht zu Ende geführten Versuchs Nr. 3 aufgenommen. Werden diese Ergebnisse nicht in Betracht gezogen, so fallen die Zahlen noch mehr zugunsten unserer Auffassung aus (siehe die Angaben in Klammern).

Der Untergang der vakzinierten Pflanzen in 55,1% kann vielleicht durch die Unvollkommenheit unserer Vakzinationsmethode erklärt werden. Es ist deshalb unsere nächste Aufgabe, durch Anwendung einer verbesserten Vakzinationsmethode eine stärker ausgeprägte Immunität zu erzielen[1]).

Es erheben sich aber noch die Fragen:

1. ob nicht die größere Resistenz der vakzinierten Pflanzen gegen Infektion vom Vorhandensein der Würze, die zur Wasserkultur hinzugefügt wurde, abhängt und nicht von den gelösten Stoffwechselprodukten des Pilzes, die wir als Vakzine bezeichnen.

2. ob nicht die mechanische Schädigung (Einstich), also nicht die Infektion, die Ursache des Zugrundegehens der Pflanzen ist.

In unserer Arbeit versuchten wir zweimal diese Kontrollen unter denselben Bedingungen, wie in den Versuchen mit der Vakzination durchzuführen, indem wir anstatt des Filtrats und der Bouillonkultur des Pilzes gewöhnliche sterile Bouillon (Malz) benutzten. Wenn die Pflanzen in der Vakzine sich, wenn auch ungenügend, entwickelten, so gingen die Bohnen beim Hinzufügen einer gewöhnlichen sterilen Bouillon (Würze) ausnahmslos alle zugrunde; in der Würze (10 proz. Lösung in der Knopschen Flüssigkeit) entwickelten sich bei diesen nichtsterilen Bedingungen schnell Bakterien, was nicht der Fall war, wenn man zur Knopschen Flüssigkeit Vakzine hinzufügt; trotzdem kann das Fehlen der erwähnten Kontrollen nicht die Tatsache der erhöhten Resistenz der vakzinierten Bohnen entkräften; natürlich muß diese Kontrolle unter sterilen Bedingungen mit Wasserkulturen durchgeführt werden, was weiterhin auch geschehen wird.

[1]) In einer Arbeit von Arnaudi, die wir eben erhalten haben, wird eine Vakzination des Tabaks gegen Wurzelfäule mittels trockener Vakzination beschrieben, die bessere Resultate gibt.

Was die zweite Frage betrifft, so wurden hier die erwähnten Kontrollen durchgeführt.

Bei Anstechen der vakzinierten und der Kontrollpflanzen mit einer sterilen Nadel (ohne Eintragung einer Infektion) haben wir kein Zugrundegehen der Pflanzen beobachtet.

Außer den obenerwähnten Kontrollen ließen wir in zwei Versuchen, ohne Infektion und ohne Einstich, einen Teil der vakzinierten Pflanzen. Die letzteren entwickelten sich normal und gingen auch nicht zugrunde.

Die vakzinierten Pflanzen waren niedriger als die Kontrollen, ihr Stengel war aber bedeutend dicker und die Blätter waren stärker entwickelt.

Das Aussehen der Einstichstelle bei der Infektion war bei vakzinierten und Kontrollpflanzen gleichfalls verschieden. Während bei den vakzinierten die Wunde durch einen schmalen schwarzbräunlichen Streifen scharf umsäumt war, welcher aus bei der Infizierung (Einstich) geschädigten und abgestorbenen Zellen bestand, sind bei den Kontrollpflanzen die Wunden von einem dunklen, braunen Fleck umgeben, der scharf von dem übrigen grünen Gewebe des Stengels abgegrenzt ist und den Umfang der Wunde bedeutend übersteigt. Ein derartiger Fleck bildet sich durch Absterben und Schrumpfung der Zellen. In der Mehrzahl der Fälle geht dieser Prozeß des Absterbens ziemlich tief in den Stengel hinein, so daß auf dem Querschnitt der äußere Teil eine braune, schichtartige Zone darstellt, die an manchen Stellen durch unregelmäßige Zellhohlräume unterbrochen wird. (In den Zeichnungen der nicht übertuschte Teil.)

Was das Wurzelsystem betrifft, so haben wir, wie auch viele andere Verff., einen stark ausgeprägten Unterschied zwischen den Kontrollen und den vakzinierten Pflanzen festgestellt. Während das Wurzelsystem der Kontrollpflanzen gut ausgebildet war, war die Schädigung des Wurzelsystems der vakzinierten Pflanzen sehr deutlich: es war kurz, mit sehr wenigen Nebenwurzeln, seine Farbe war gelblich.

Gegen Ende des Versuchs, wenn die Vakzine schon weggegossen und durch die Knopsche Flüssigkeit ersetzt war, erholte sich das Wurzelsystem etwas. Aber auch am Ende der Versuche unterschied sich das Wurzelsystem der vakzinierten Pflanzen von demjenigen der Kontrollen. Dasselbe kann man aber nicht vom Allgemeinzustand der vakzinierten Pflanzen sagen.

Es war zweifellos von Interesse, festzustellen, wie sich der Zustand der erworbenen Immunität in der anatomischen Struktur oder den physiologischen Funktionen der Pflanzen auswirkte. Zur Klärung dieser Frage untersuchten wir: 1. infizierte vakzinierte Pflanzen und Kontrollen (beide mit dem Pilz infiziert), die durch die Infektion zugrunde gegangen waren oder dieselbe überstanden hatten; 2. vakzinierte Pflanzen und Kontrollen, die zwar einen Einstich erhalten, aber nicht infiziert worden waren, und endlich 3. vakzinierte Pflanzen und Kontrollen, die weder durch Einstich verletzt noch der Infektion unterworfen worden waren.

Anatomische Untersuchung.

Das Studium der anatomischen Struktur der Stengel wurde an Querschnitten, die mit einem Rasiermesser mit der Hand ausgeführt wurden, unternommen. Die Schnitte wurden quer durch die ganze Wunde geführt und

nach oben und unten je 2 cm. Bei nichtgeschädigten Pflanzen wurden die Schnitte in derselben Höhe wie bei den geschädigten angelegt.

I. Anatomische Struktur der nichtgeschädigten und nichtinfizierten Pflanzen.

a) Kontrollpflanzen (nicht vakziniert); die Struktur des Stengels entspricht der für Dikotyledonen dieses Alters üblichen: Epidermis, Rinde, schwach ausgeprägtes Perizykel, Gefäßbündel, Mark.

b) Die vakzinierten Pflanzen unterscheiden sich etwas von den Kontrollen. Wie wir schon erwähnt haben, haben die vakzinierten Pflanzen einen kürzeren und dickeren Stengel. Anatomisch äußert sich das in einer stärkeren Entwicklung der Rinde und des Marks, sowie in einigen anderen anatomischen Eigentümlichkeiten. Das gegenseitige Verhältnis der anatomischen Struktur der vakzinierten Pflanzen und der Kontrollen ohne Schädigung oder Infektion ist in Tab. 4 dargestellt.

Tabelle 4.

Gewebe	Kontrollen (nicht vakzinierte Pflanzen)	Vakzinierte Pflanzen
Kambium	Einschichtig nur in Bundeln	Besteht aus mehreren radiären Zellschichten. Bildet manchmal einen geschlossenen Ring. Die Zellen sind bedeutend kleiner als bei den Kontrollen
Protoxylem	Nur einige Gruppen an der Peripherie des Stengels	Mehr Gruppen von Protoxylem als bei den Kontrollen
Rinde und Mark . .	Übliche fur das gegebene Alter	Mehr Schichten als bei den Kontrollen. Die Zellen, die den Ring der Gefäße u. Faserbundel umgeben, sind kleiner, ebenso die Zellen des zwischen den Bundeln liegenden Parenchyms

Die Verschiedenartigkeit der vakzinierten Bohnen weist anscheinend auf eine erhöhte Lebenstätigkeit derselben hin, was zu einer schnelleren Differenzierung der Gewebe führt.

II. Anatomische Struktur der geschädigten, aber nicht infizierten Pflanzen.

Nach ihrer Reaktion auf die Verwundung unterscheiden sich die vakzinierten Pflanzen gleichfalls von den Kontrollen, wie aus der Tab. 5 zu ersehen ist.

Man kann darauf hinweisen, daß die Verwundung nichtvakzinierter Pflanzen unbedeutende Veränderungen in der Struktur des Stengels hervorruft.

Dagegen ist bei den vakzinierten Bohnen die Reaktion auf die Schädigung stärker ausgeprägt und erfaßt einen größeren Teil des Stengels im Vergleich zu den Kontrollen. Mit anderen Worten, die vakzinierten Pflanzen reagierten intensiver auf die Verwundung als die Kontrollen.

Tabelle 5.

Gewebe	Verwundete Kontrollpflanzen	Vakzinierte und verwundete Pflanzen
Kambium . .	Besteht in dem der Wunde am nächsten liegenden Bündel aus mehreren radiaren Schichten. In tangentialer Richtung überschreiten sie nicht die Grenzen der Bündel	Am Rand der Wunde bilden sich einige (mehr als bei den Kontrollen) radiare Schichten; sie verlaufen in tangentialer Richtung streifenartig vom Wundrand in einiger Entfernung an der Peripherie des Stengels. Manchmal (aber nicht regelmäßig) bildet es geschlossene Ringe. Die Zellen sind kleiner als bei den Kontrollen
Protoxylem . .	Am Wundrand nicht zahlreiche Gruppen von Protoxylem	Bildet einen ununterbrochenen Streifen oder viele Gruppen von Protoxylem, vom Wundrand beginnend und weiter, manchmal auf einer ziemlich bedeutenden Strecke an der Peripherie des Stengels sich hinziehend. Die Zellen sind kleiner als bei den Kontrollen

III. Anatomische Struktur infizierter Pflanzen.

Die Entwicklung der Gewebe bei den Kontrollen sowie bei den vakzinierten Pflanzen, die die Infektion überstanden haben, ist in Tab. 6 und 7 dargestellt.

Tabelle 6.

Gewebe	Nichtvakzinierte Kontrollpflanzen	Vakzinierte Pflanzen
Kambium . .	An den Wundrändern kleinzellige Zone, die in radiarer und tangentialer Richtung durch einige Reihen Zellen begrenzt ist und vom umgebenden Gewebe scharf abgetrennt ist	Vom Wundrand angefangen geht ein breiter, vielschichtiger Streifen kleiner Zellen, der sich immer mehr verengt. An der ganzen Peripherie des Stengels ein vielschichtiger Kambiumring
Protoxylem . .	Gleich am Wundrand nicht zahlreiche Zellengruppen. Jede von diesen Gruppen besteht aus einer geringen Zahl von Zellen (2—4)	Ununterbrochene Streifen oder viele Zellgruppen. In jeder Gruppe bis zu 15 Zellen. An der ganzen Peripherie des Stengels ist die Zahl der Protoxylemzellgruppen größer als bei den Kontrollen.
Perizykel . . .	Mehrschichtig in Form eines kleinen Bezirks neben der Wunde	Vielschichtig in Form einer Zone ziemlich breit am Wundrand und in einiger Entfernung davon und weiter ab von der Wunde etwas verengt

Bei allen Pflanzen äußert sich die Reaktion auf die Verwundung und Infizierung am stärksten am Ort der Verwundung und Infizierung. Unterhalb der Wunde ist diese Reaktion (Entwicklung des Kambiums und des Protoxylems) nicht so stark ausgeprägt, ist aber bis zu dem über der Erde befindlichen Teil der Wurzel gut festzustellen. Oberhalb der Verwundungsstelle nimmt der Stengel schneller die übliche Struktur an.

Einen großen Unterschied mit den eben beschriebenen Pflanzen (die die Infektion überstanden haben) stellen diejenigen Pflanzen dar, die durch die Infektion zugrunde gegangen sind.

In Tab. 7 sind die Kontrollpflanzen sowie die vakzinierten Pflanzen, die nach der Infektion zugrunde gegangen sind, gegenübergestellt.

Tabelle 7.

Gewebe	Kontrollpflanzen	Vakzinierte Pflanzen
Kambium . .	Nur in Primärbündeln	Am Wundrand ein kleiner Bezirk. Seine Zellen sind größer als die Zellen der vakzinierten und nicht zugrundegegangenen Pflanzen
Protoxylem . .	Primäre, schwach entwickelte Bündel	Entsteht in den Kambiumbezirken am Wundrand meistens nicht. In Einzelfällen entstehen 2—4 Zellen

Es ist zu vermerken, daß bei den zugrunde gegangenen Pflanzen (vakzinierten und Kontrollen), die dem Ring der Bündel und des Kambiums entsprechende Zwischenschicht weniger scharf im Vergleich zu den überlebenden Pflanzen hervortritt und aus relativ größeren Zellen zusammengesetzt ist. Überhaupt unterscheiden sich die zugrunde gegangenen Pflanzen durch ihre weniger entwickelte Gewebedifferenzierung ziemlich bedeutend von denjenigen, die die Infektion überstanden haben.

Die Menge des Pilzes ist bei verschiedenen Pflanzen ungleich: Bei den Pflanzen (Kontrollen und vakzinierte), die die Infektion überstanden haben, wächst der Pilz in Form eines leichten Belags an den Wundrändern, in das Innere des Stengels dringt er gar nicht oder nur in Form einzelner Hyphen ein.

Die durch die Infektion zugrunde gegangenen Pflanzen (Kontrollen und vakzinierte) sind in allen Richtungen von dem Pilzmyzel durchsetzt. Manchmal beobachtet man sogar Myzelnester in den Höhlen zwischen den abgestorbenen Zellen des Wirtes.

Bei Gegenüberstellung der anatomischen Struktur der vakzinierten und der Kontrollpflanzen kann man sehen, daß die vakzinierten in ihren Lebensäußerungen aktiver sind, was sich in der schnelleren Entwicklung und Differenzierung der Gewebe, hauptsächlich des Kambiums und des Protoxylems äußert. Das Kambium der vakzinierten Pflanzen bildet einen geschlossenen mehrschichtigen Ring, was bei den Kontrollpflanzen desselben Alters nicht beobachtet wird. Das Protoxylem bildet eine größere Zahl von Gruppen mit einer größeren Zellmenge in jeder Gruppe. Der Einfluß der Vakzination äußert sich schon bei den nicht geschädigten und nicht infizierten Pflanzen.

Die Reaktion auf die Verwundung ist bei den vakzinierten Pflanzen schärfer ausgeprägt und besser feststellbar. Sie äußert sich auch durch eine verstärkte Entwicklung des Kambiums und des Protoxylems.

Am stärksten äußert sich die Wirkung der Vakzination bei vakzinierten Pflanzen, die die Infektion überstanden haben. Bei ihnen ist das Kambium und das Protoxylem sowie das Perizykel besonders stark entwickelt. Es ist möglich, daß die starke Entwicklung dieser Gewebe durch die stärkere Differenzierung und somit auch eine etwas andere Reaktion derselben bedingt ist. Es ist zwar bei den Kontrollpflanzen, die die Infektion über-

standen haben, das Kambium gleichfalls in Form einer Zone neben der Wunde entwickelt, aber bei allen von uns untersuchten Kontrollpflanzen ist seine Entwicklung nicht so bedeutend, wie bei den vakzinierten Pflanzen. Gewöhnlich ist die Kambiumzone weniger entwickelt.

Außerdem muß berücksichtigt werden (was wir schon in dem ersten Teil der Arbeit erwähnt haben), daß die Kontrollpflanzen in einem gewissen Prozentsatz die Infektion überstanden haben, d. h. sie besaßen anscheinend eine gewisse natürliche individuelle Immunität.

Es ist nicht unmöglich, daß die sichtbaren Äußerungen der naturlichen und erworbenen Immunität sich ähneln. Die Struktur der Kontrollen und der vakzinierten Pflanzen, die durch die Infektion zugrunde gegangen sind, weist gleichfalls auf den Zusammenhang der erwähnten anatomischen Veränderungen mit der Resistenz der Pflanzen gegen Erkrankungen hin. Bei den Kontrollen ist das Kambium fast ganz unentwickelt und das Protoxylem ist gleichfalls sehr schwach entwickelt. Bei vakzinierten zugrunde gegangenen Pflanzen ist das Kambium vorhanden. aber sehr schwach entwickelt. Das weist auf eine minimale Aktivität der Pflanzen hin, die die Überwindung der Infektion unmöglich machte und zum Untergang der Pflanzen führte. Anderseits aber weist die, wenn auch sehr geringfugige Entwicklung des Kambiums auf einen gewissen Einfluß der Vakzine hin, die die Lebenstätigkeit der Pflanzen etwas erhöht hat.

Indem wir hiermit den anatomischen Teil abschließen, müssen wir betonen, daß es ein grober Fehler wäre, in den anatomischen Veränderungen die ersten und einzigen Faktoren der Immunität zu sehen. Das sind nur die äußeren, unserem Studium am meisten zugänglichen Erscheinungen der erworbenen Immunität.

Ihr Wesen liegt viel tiefer.

Außer den anatomischen Untersuchungen wurde die Untersuchung der Lebenstätigkeit der Gewebe der Versuchs- und Kontrollpflanzen unternommen. Die Untersuchung wurde mittels Plasmolyse ausgeführt. Die Gewebe der Kontrollpflanzen sowie der vakzinierten (der nicht verwundeten sowie der verwundeten, aber nicht infizierten) bewahren die Lebenstätigkeit ihrer Zellen im Gebiet der Wunde sowie uber- und unterhalb derselben.

Die vakzinierten und Kontrollpflanzen, die eine Infektion überstanden haben, sind gleichfalls vollkommen lebensfähig: die Zellen aller Gewebe können im Gebiet der Wunde sowie außerhalb derselben plasmolysiert sein mit dem Unterschied. daß bei den Kontrollpflanzen der Inhalt der Zellen im Wundgebiet nach der Plasmolyse nicht eine regelmäßige runde Form, sondern die Form einer Linse oder eine unregelmäßige Form annimmt, während die Zellen der vakzinierten Pflanzen eine runde Form der Plasmolyse zeigen. Die durch die Infektion zugrunde gegangenen Pflanzen unterscheiden sich gleichfalls etwas voneinander: die Kontrollen gehen vollständig zugrunde und ihre Zellen zeigen nirgends auf dem ganzen Stengel, weder oberhalb noch unterhalb der Wunde, eine Plasmolyse, während bei den vakzinierten Pflanzen in einiger Entfernung nach unten von der Wunde unter den abgestorbenen Zellen solche vorkommen, die die Fähigkeit zur Plasmolyse noch erhalten haben; je weiter von der Wunde entfernt, desto mehr findet man solche Zellen.

In Bestätigung der Ergebnisse einer Reihe von Autoren kommen wir zu dem Schluß, daß eine erworbene Immunität bei Pflanzen möglich ist.

Dieses Problem ist noch sehr neu und enthält noch viele ungelöste Fragen, zweifellos werden sie in nächster Zukunft gelöst werden.

Herrn Prof. L. I. Kursanow möchten wir fur seine standigen Ratschlage, sowie Frau Prof. A. I. Rokitzky fur ihre Hilfe bei Gewinnung des Untersuchungsmaterials unseren verbindlichsten Dank aussprechen. Ebenso Herrn Prof. Carbone, der uns schriftlich methodische Hilfe geleistet hat.

Schlußfolgerungen.

1. Bei der Vakzination verschiedener Bohnensorten durch Zusatz eines Filtrats einer Bouillonkultur des Pilzes Toile zur Erde oder zur Wasserkultur der Pflanzen gelingt es, eine erhöhte Resistenz gegenüber einer nachfolgenden Infektion zu erhalten.

2. Vakzinierte Bohnen bleiben in 42,2% (Mittelwert) am Leben, nicht vakzinierte Kontrollen nur in 4,3%.

3. Trotzdem die vakzinierten Pflanzen im Vergleich zu den Kontrollen im Wachstum zurückbleiben und ein geschädigtes Wurzelsystem besitzen, sind sie gegen Infektion bedeutend resistenter als die Kontrollen.

4. Die erhöhte Lebenstätigkeit der vakzinierten Pflanzen äußert sich auch in der anatomischen Struktur und zwar in einer starken Entwicklung des Kambiums, des Protoxylems und in einigen Fällen des Perizykels, unabhängig davon, ob die Bohnen infiziert oder nicht infiziert waren oder ob sie nur verwundet oder ohne Verwundung und Infektion belassen wurden.

5. Die Reaktion der Pflanzen auf die Vakzination ist am stärksten bei denjenigen Pflanzen, die eine Infektion überstanden haben.

6. Nichtvakzinierte Kontrollbohnen, die eine Infektion überstanden haben, zeigen dieselben Veränderungen wie die vakzinierten, mit dem Unterschied, daß diese Veränderungen geringer sind als bei den vakzinierten.

7. Kontrollen und vakzinierte Pflanzen, die durch die Infektion zugrunde gegangen sind (die ersten in 90,2%, die zweiten in 55,1%), haben kein oder fast kein Kambium.

Literatur.

1. Carbone e Arnaudi, L'immunità nelle piante. (Monograf. 1930.) — 2. Nobecourt, Contr. à l'étude de l'immunité chez les végétaux. Tunis (Baillier) 1928. — 3. Beauverie, C. r. Acad. d. Sc. Vol. 193. 1901. — 4. Carbone und Kaliaew, Phytopathol. Ztschr. Bd. 5. H. 1. 1932. — 5. Jarach, Ebenda. Bd. 15. H. 3. 1932. — 6. Vavilov, Immunity of plants to infektious diseases. (Monograf. Moscou. 1910.) — 7. Fride, Social. Rekonstruktion u. Wissenschaft. No. 2—3. [Russ.] — 8. Kaliaew, G., Fortschritte der modernen Biologie. Nr. 3—4. 1934. [Russ.]

Nachdruck verboten.

Über den Einfluß des bei der Azetonbutylgärung entstehenden Azetons und Butylalkohols auf diese.

[Aus dem Laboratorium für technische Mikrobiologie des Chemo-Pharmazeutischen Forschungsinstitutes zu Moskau.]

Von Leo Tschekan.

Mit 8 Abbildungen im Text.

Bei dem durch Clostridium acetobutylicum hervorgerufenen Gärungsprozeß einer 8 proz. Maismehlmaische erfolgt nicht immer das vollständige Vergären der Kohlenhydrate. Bei der Anhäufung von 15—18 g Azeton und Butylalkohol pro l enthält die Flüssigkeit nach der Gärung manchmal noch bis 0,4—0.5% Kohlenhydrate. Die Erhöhung der Stärkekonzentration der Maische oder die Zugabe der Stärke am Schlusse des Gärungsprozesses führen zu keiner beträchtlichen Steigerung der Stoffwechselausbeute und vergrößern die Menge der nicht vergorenen Kohlenhydrate.

Hieraus entstand die Voraussetzung, daß, ebenso wie bei den anderen Gärungsprozessen, die Anhäufung gewisser Mengen der Stoffwechselprodukte die Azetonbutylgärung trotz dem Vorhandensein beträchtlicher Quantitäten von Gärmaterial in der Maische, hemmen und zum Stillstand bringen. In diesem Sinne müßten von den Stoffwechselprodukten des Cl. acetobutylicums das Azeton und der Butylalkohol, als dominierende Gärprodukte, die größte Bedeutung haben. Die anderen Produkte werden entweder in verhältnismäßig geringen Mengen angehäuft, oder teilweise im Laufe der Gärung verbraucht (Äthylalkohol und die höheren Alkohole, Azetaldehyd, Säuren).

Die Literaturangaben über die Wirkung von Azeton und Butylalkohol auf Bakterien sind recht spärlich. Für die Bakterien der Buttersäuregärung, einer den Azetonbutylbakterien nahestehenden Gruppe, sind die Beobachtungen von Fitz[1]) von Bedeutung; letzterer konstatierte, daß eine Zugabe von norm. Butylalkohol zu einer Kultur des Bac. butylicus (Granulobact. saccharobut.) auf Fleischbouillon mit Glyzerin die Entwicklung der Bakterien hemmt. Bei einer Konzentration des Butylalkohols von 0,9 bis 1,0 Gewichtsprozenten hört das Wachstum vollständig auf.

Für die Gruppe der Azetonbutylbakterien haben Weyer und Rettger[2]) festgestellt, daß eine Zugabe von 3% Azeton zu Malzagar keine Wirkung auf die Entwicklung der Kolonien des Cl. acetobutylicum auf festem Nährboden ausübt, während beim Zufügen von 1% eines Gemisches aus Butylalkohol und Azeton (im Verhältnis 3 : 1) zum Agar die Petrischalen steril bleiben. Da sich die Verff. das Studium dieser Stoffwechselprodukte als Antiseptici gegen die nebenbei auftretende Mikroflora (hauptsächlich gegen B. mesentericus) zum Ziel gesetzt hatten, be-

[1]) Fitz, A., Über Spaltpilzgärungen. (Berichte. 1882. S. 867.)

[2]) Weyer and Rettger, A comparative study of six different strains of the organism commonly concerned in lage-scale production of butyl-alcohol and aceton by the biological process. (Journ. of Bact. Vol. 14. 1927. p. 399.)

faßten sie sich nicht mit der Wirkung des Butylalkohols und des Azetons auf den durch Cl. acetobutylicum hervorgerufenen Gärungsprozeß und beschränkten sich infolgedessen nur auf Kulturen auf festen Nährböden.

Es wäre wünschenswert, letzteres eingehender zu studieren und den Effekt der Azeton- und Butylalkoholzugabe zur Kultur des Cl. acetobutylicums und auch die Konzentrationen, welche eine Verlangsamung der Gärung veranlassen, festzustellen.

Trotzdem die Voraussetzung, daß die bei der Gärung entstehende Kohlensäure irgendwelchen Einfluß auf die Entwicklung solch eines Anaeroben wie Cl. acetobutylicum ausuben könnte, recht unwahrscheinlich erscheint, wurden dennoch Gärversuche einer 8 proz. Maismehlmaische durchgeführt, wobei der Nährboden mit gereinigter, gewaschener und steriler Kohlensäure gesättigt und das zur Kultur dienende Gefäß mit ebensolcher Kohlensäure gefüllt wurde. Als Kontrolle diente eine Reihe ebensolcher mit Verschlüssen versehener Erlenmeyerkolben mit 300 ccm einer 8 proz. Maismehlmaische, die unter gewöhnlichen Bedingungen ohne Entfernen der Luft beschickt wurden. Zu den Versuchen diente die dritte Generation einer Bakterienkultur. Nach der Impfung wurden die Kolben in einen Thermostaten bei 37° C gestellt und dort 3 Tage gelassen. Nach Verlauf dieser Frist wurden die Mengen des ausgeschiedenen Gases, des Azetons, die titrierbare Azidität und der Restzucker[1]) bestimmt.

Wie die unten angeführten Ergebnisse (Tab. 1) zeigen, ließ sich kein erheblicher Unterschied in der Zusammensetzung der Gärflüssigkeit feststellen, somit kann von einer ungünstigen Wirkung der Kohlensäure auf die Gärung nicht die Rede sein.

Tab. 1. Die Garung bei Sattigung des Nahrbodens mit Kohlensäure.

	Nr.	Gas in g/%	Azeton in g/‰	Aziditat	Zucker in %
CO_2	1	3,3	5,3	3	0,1
	2	3,2	5,1	2,94	0,17
	3	3,09	5,2	2,96	0,23
Kontrolle bei Luftzutritt . . .	4	3,2	5,07	3,2	0,1
	5	3,1	5,2	3	0,28
	6	3,3	5,1	2,79	0,15

Das Azeton wurde zuerst angewandt. Das zu den Versuchen dienende Azetonpräparat war aus dem Gärungsazeton durch Trocknen mit Pottasche und Chlorkalzium und wiederholter Destillation hergestellt worden. Dieses Azeton enthielt bei einem spez. Gewicht von 0,8009 bei 15° C und einer Siedetemperatur von 56,2° bei 758 mm Druck in 1 ccm 0,8 g jodometrisch bestimmbaren Azetons.

Zu der mit der Kultur beschickten Maische wurden 1,6—2,4 Gewichtsprozente Azeton zugefügt. Nach gründlichem Durchmischen hielt man die Kultur 3 Tage im Thermostat bei 37° C. Der Verlust an gasförmigen Produkten wurde periodisch nach dem Gewicht festgestellt.

[1]) Das Gas wurde nach dem Gewicht, das Azeton — jodometrisch, die Azidität — durch Titrieren mit 0,1/N NaOH, der Zucker — durch Hydrolyse nach Bertran — bestimmt.

Der Verlauf der Gärung nach dem Ausscheiden des Gases ist auf Abb. 1 wiedergegeben. Die Resultate der Schlußanalysen der Versuchsreihe sind unten angeführt (Tab. 2).

Tab. 2. Die Wirkung des Azetons auf die Gärung. Serie Nr. 2.

Gewicht in % d. zugeführten Azetons	Gas in g/%	Gesamt-azeton in g/‰	Entstandenes Azeton in g/‰	Azidität	Zucker in %
0	3,2	5,3	5,3	3,8	0,28
0,16	3,36	7,0	5,4	4,2	0,33
0,4	3,1	8,8	4,8	3,7	0,63
0,8	3,24	12,4	4,4	2,9	0,53
2,4	2,46	28,3	4,3	3,4	1,87

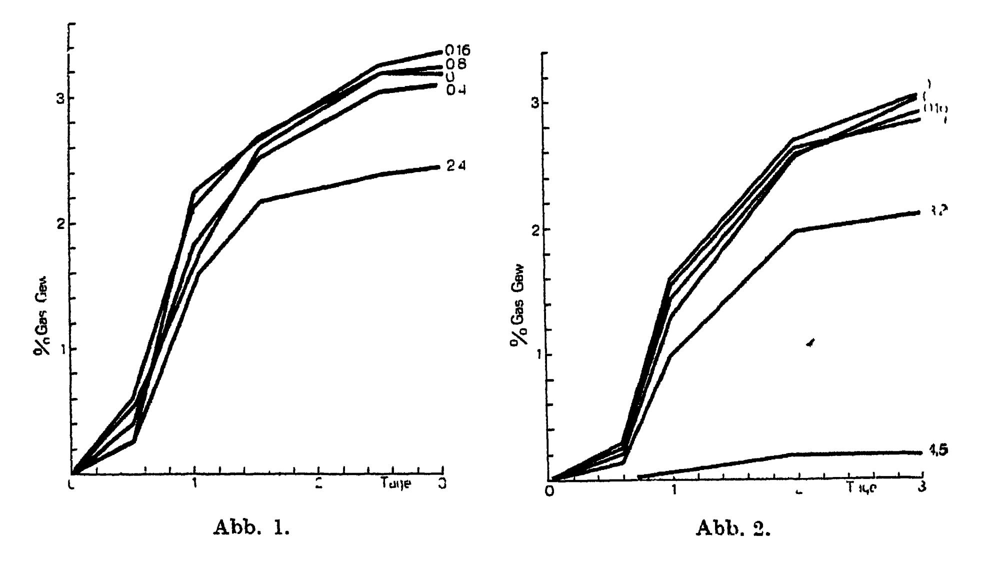


Abb. 1. Abb. 2.

Die Versuche zeigen, daß das Zufügen von Azeton den Gärungsprozeß nur schwach hemmt.

Tab. 3. Die Wirkung des Azetons auf die Gärung. Serie Nr. 3.

Gewicht in % d. zugeführten Azetons	Gas in g/%	Gesamt-azeton in g/‰	Entstandenes Azeton in g/‰	Azidität	Zucker in %
0	3,07	5,08	5,08	3,2	0,14
0,26	2,83	7,7	5,1	2,43	1,32
0,8	3,05	12,81	4,81	2,15	1,52
1,6	2,9	20,26	4,26	2,3	1,01
3,2	2,1	35,1	3,1	3,2	2,5
4,5	0,19	44,8	0	0,89	6,2

Wiederholte, unter denselben Bedingungen durchgeführte Kulturserien mit Zugabe von Azeton von 0,26—4,5% bestätigten die im ersten Versuch erhaltenen Resultate. Der unten angeführte Verlauf der Gärung einer der

Versuchsreihen (Abb. 2) stimmt nach den Resultaten mit der vorhergehenden überein. Die Schlußanalysen dieser Serie sind auf Tab. 3 angeführt.

Beim Summieren der Resultate der Versuche mit Azetonzugabe stellt es sich heraus, daß: 1. das Zufügen von Azeton in den Grenzen bis 1,6% die Gärung nur schwach beeinflußt, 2. eine bemerkbare Schwächung der Gärung bei einer Konzentration von 2.4 und mehr Gewichtsprozenten eintritt, 3. 4,5% Azeton die Gärung stark hemmten.

Wenn man jedoch in Betracht zieht, daß unter natürlichen Bedingungen die Anhäufung von Azeton nicht 0,6—0,7% übersteigt, d. h. solche Mengen, welche die Bakterien gut vertragen, kann man wohl kaum annehmen, daß die Anhäufung desselben als Endprodukt in der Kultur ein vollständiges Vergären der Kohlenhydrate verhindert.

Auf die gleiche Weise wurden Kulturen mit Butylalkoholzugaben angelegt.

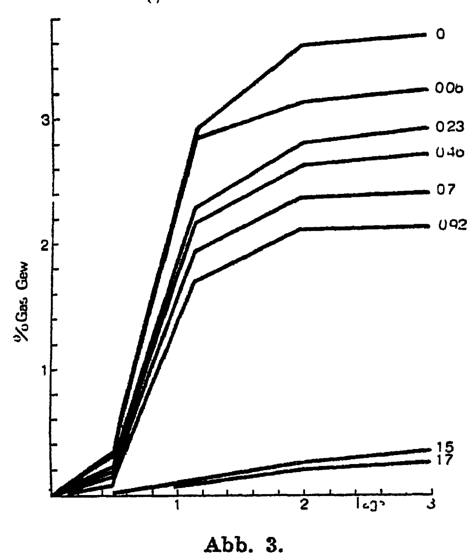


Abb. 3.

Reiner Butylalkohol wurde durch mehrfache Destillation eines mit Pottasche getrockneten Gärungsproduktes gewonnen. Der trockene Butylalkohol besaß folgende Eigenschaften:

Spez. Gewicht bei 15° C . .	0,8100
Siedepunkt	117,4° C
Azidität (nach Essigsaure) .	0,004
Gehalt an Aldehyden . . .	0.

Die Kulturen wurden ebenso wie in den Versuchen mit Azeton angelegt. In jeden Kolben wurden 0,06 bis 1,7 Gewichtsprozent gebracht. Der Gärungsverlauf nach dem Ausscheiden des Gases ist auf Abb. 3 wiedergegeben.

Bei der Besichtigung des Diagramms sieht man, daß eine bestimmte Abhängigkeit des Gärungsprozesses von der Menge des zugesetzten Butylalkohols besteht. Die Zugabe von 0,06% ruft schon einige Verminderung der Quantität des ausgeschiedenen Gases hervor. Ungefähr 1% hat die Verminderung der Gasbildung auf die Hälfte zur Folge. 1,5% hemmt die Gärung in hohem Maße. Die Endanalyse der Gärflüssigkeiten ergab folgende Resultate (Tab. 4).

Tab. 4. Die Wirkung des Butanols auf die Garung. Serie Nr. 4.

Gewichts-% des zugefugten Butylalkohols	Gas in g/%	Azeton in g/‰	Sauregrad	Zucker in %
0	3,66	5,07	3	0,1
0,06	3,23	5	3,1	0,13
0,23	2,9	4,8	3,3	0,27
0,46	2,7	4,2	3,2	0,5
0,7	2,4	3,8	3,6	1,2
0,92	2,14	2,6	3,4	2,1
1,5	0,36	Spuren	1,8	6,1
1,7	0,26	,,	2	5,9

Somit tritt mit der Erhöhung des Butylalkoholgehaltes eine immer stärker werdende Verlangsamung der Gärung und bei einem Gehalt desselben von 1,5% in der Nährlösung ein vollkommener Stillstand ein.

In Tab. 5 sind die Resultate einer weiteren Versuchsserie mit Butylalkohol angeführt (Abb. 4).

Tab. 5. Die Wirkung des Butanols auf die Gärung. Serie Nr. 5

Gewichts-% des zugefügten Butylalkohols	Gas in g/%	Azeton in g/‰	Säuregrad	Zucker in %
0	3,43	5,38	2,9	0,1
0,08	3,4	5,1	3,1	0,15
0,65	2,8	3,6	3,6	1,6
0,81	2,32	2,95	3,9	1,8
1,13	1,23	2,0	3,6	2,5
1,7	0,24	Spuren	1	6,0
2,27	0,06	0	0,8	6,2

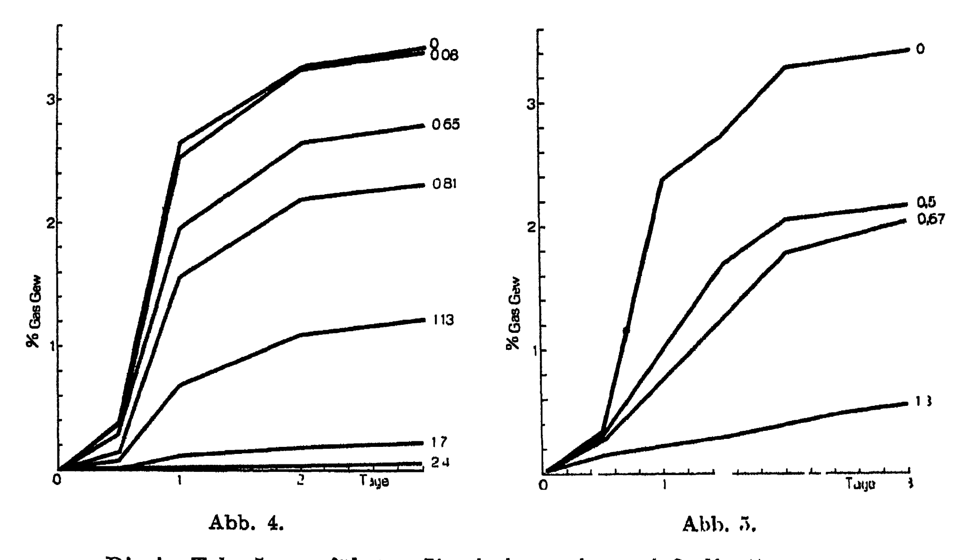


Abb. 4. Abb. 5.

Die in Tab. 5 angeführten Ergebnisse zeigen, daß die Gegenwart von Butylalkohol, bei einem 1,13% überschreitenden Gehalt desselben in der Kultur die Gärung beim Vorhandensein von Nährstoffen in der Maische hindern kann.

Außer der Anwendung von reinem Butylalkohol ist eine Versuchsserie Nr. 6 auch mit technischem, durch Gärung erhaltenem Butylalkohol durchgeführt worden. Letzteres besaß folgende Eigenschaften:

Spez. Gewicht bei 15° C	0,8141
Die Bedingungen bei der Destillation bei 767 mm	117,0—117,6 = 97%
Azidität	0,007% nach Essigsäure
Gehalt an Aldehyden	Spuren
Bei der Zugabe einer 30% NaOH-Lösung (1 : 1)	schwach gelbe Färbung.

Der Verlauf der Gärung nach der Gasbildung ist auf Abb. 5 wiedergegeben. Die Endanalyse ergab folgende Resultate:

Tab. 6. Die Wirkung des Butylalkohols auf die Gärung Serie Nr. 6.

Gewichts-% des zugefügten Butylalkohols	Gas in g/%	Azeton in g/‰	Säuregrad	Zucker in %
0	3,4	4,95	3,1	0,2
0,5	2,18	2,7	4	1,7
0,67	2,04	2	3	2,8
1,3	0,57	Spuren	2,3	4,8

Auf Grund dieser Ergebnisse kann man den Schluß ziehen, daß der technische Butylalkohol, ebenso wie der reine, den Gärungsprozeß hemmt. Bei 1,3% Butylalkohol war die Gasausscheidung höchst gering und die Endanalyse ergab nur Spuren von Azeton.

Es ist ersichtlich, daß das Butanol einen bedeutend größeren Einfluß auf die Gärung ausübt, als das Azeton, und daß die Menge des unvergorenen Zuckers sich mit zunehmenden Dosen des beigefügten Butylalkohols besonders stark vergrößert.

Abb. 6.

Als Ergänzung sind noch Versuche mit Zugabe von chemisch reinem Butylalkohol zu verschiedenen Fristen des Gärungsprozesses und zwar: 1. während der Periode des Säuremaximums (nach 18—22 Std.), 2. zur Zeit der Anhäufung der Hauptmenge des Lösungsmittels (nach 36—39 Std.), durchgeführt worden. Bei den 0,8 und 1,21% betragenden Dosen war der Effekt sehr scharf ausgedrückt; es wurde ein fast vollkommener Stillstand der Gärung beobachtet. Letzteres kann dadurch erklärt werden, daß faktisch außer dem zugefügten Butylalkohol im Nährboden noch der während der vorhergehenden Periode gebildete enthalten war. Die Gesamtmenge genügte, um die Entwicklung der Bakterien einzustellen. Außerdem wirkt der der gärenden Flüssigkeit zugefügte Butylalkohol aller Wahrscheinlichkeit nach auf die Bakterien, die sich unter normalen Bedingungen entwickelt haben, stärker, denn Bakterien, die sich im Nährboden mit vorher beigegebenem Butylalkohol entwickelt hatten, erwerben eine gewisse Resistenz gegen dasselbe.

Hieraus ist begreiflich, daß bei Zugabe von 0,81% Butylalkohol am Anfang der Kultur (Abb. 4) der gärungshemmende Effekt viel geringer ist und eine, wenn auch geschwächte Gärung stattfindet.

Nach dem Hinzufügen derselben Menge von Butylalkohol während der Gärung tritt ein fast vollkommener Stillstand der Entwicklung ein und die Gasausscheidung ist im weiteren gering.

Zur Klärung der Frage der Wirkung geringerer Dosen des Butylalkohols, bei Zugabe derselben während der Gärung, wurden 0,27 und 0,4% Butyl-

alkohol 20 und 32 Std. nach Beginn der Kultur zugefügt. Der Verlauf der Gasbildung ist auf Abb. 6 wiedergegeben. Die Analysen zum Schluß der Gärung ergaben folgende Resultate (Tab. 7).

Tab. 7. Die Wirkung des Butylalkohols auf die Gärung (zugefügt während der Gärung). Serie Nr. 7.

Gewichts-% des zugefügten Butylalkohols	Gas in g/%	Azeton in g/‰	Säuregrad	Zucker in %
0	3,3	5,8	2,07	3,1
0,27	2,54	4,9	1,5	2,6
0.27	2,55	4,9	1,52	2,7
0,4	2,4	4,8	1,87	2,45
0,4	2,17	4,5	2	2,69

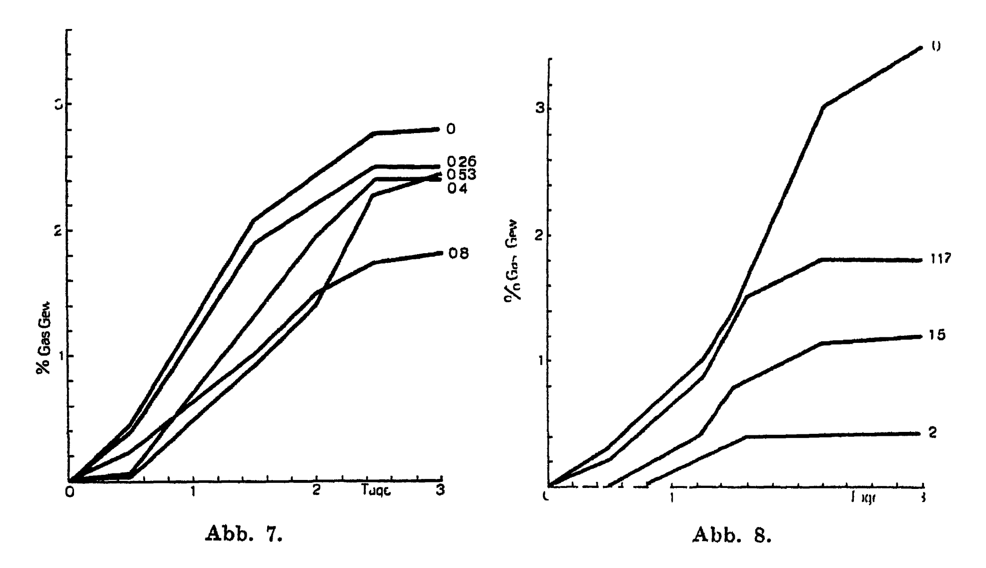


Abb. 7. Abb. 8.

Somit bleibt die auf Grund der früheren Versuchsserie aufgestellte Behauptung, daß der Wirkungseffekt des Butylalkohols bei Zugabe desselben während der Gärung größer ist, auch für Dosen des Butylalkohols unter 0,5% bestehen. Die hemmende Wirkung auf die Gärung ist schwächer bei Zugabe zu jungen Kulturen (d. h. 20 Std. nach Beginn der Gärung).

Die erhaltenen Versuchsergebnisse mit Butylalkohol geben Grund zur Voraussetzung, daß das Cl. acetobutylicum imstande ist, im Nährboden eine 1,3—1,5% nicht übersteigende Butylalkoholkonzentration zu ertragen. Die Beobachtung, daß unter natürlichen Bedingungen die Gärung durch eine Reinkultur dieser Bakterien bei der Anhäufung solcher Quantitäten von Butylalkohol aufhörte, bestätigt diese Voraussetzung.

Die nächste Aufgabe war eine möglichst genaue Erforschung der gemeinsamen Wirkung beider Stoffe in dem Verhältnis, wie sie in der Gärflüssigkeit vorkommen. Dieses Verhältnis des Butylalkohols und Azetons kann zum Schluß der Gärung ungefähr durch die Zahlen 3 : 2 ausgedrückt werden. Um jedoch die Resultate der Versuche mit den Ergebnissen von Weyer

und Rettger, welche den Einfluß eines Gemisches von Butylalkohol und Azeton im Verhältnis von 3 : 1 auf die Entwicklung von Bakterien in Petrischalen untersucht hatten, vergleichen zu können, wurde ein Gemisch dieser Stoffe im selben Verhältnis angewandt. Dieses Gemisch wurde bei den Versuchsserien 8 und 9 (siehe Abb. 7 und 8) zugefügt. Die Resultate zeigen, daß der Verlauf des Gärungsprozesses in diesem Fall von der Norm abweicht und größtenteils von der Menge des Butylalkohols in der Mischung abhängt; bei 2% ist der Hemmungseffekt bedeutend, was wahrscheinlich damit in Verbindung steht, daß drei Viertel der zugesetzten Mischung aus Butylalkohol besteht, dessen Gehalt in der Gärflüssigkeit sich im gegebenen Fall 1,5% nähert. Die Schlußanalysen dieser Serien ergaben folgende Resultate.

Tab. 8 und 9. Die Wirkung eines Gemisches von Butylalkohol und Azeton (3: 1) auf die Garung. Serie Nr. 8 und 9.

Gewichts-% d. zugefugten Mischung	Gas in g/%	Gesamtmenge des Azetons in g/‰	Zugefugtes Azeton in g/‰	Gebildetes Azeton in g/‰	Aziditat	Zucker in %
0	2,82	4,54	0	4,54	3,6	0,5
0,26	2,52	5,48	0,7	4,78	2,81	1,54
0,4	2,43	5,4	1	4,4	2,62	1,56
0,53	2,45	5,5	1,2	4,3	3,28	1,43
0,8	1,81	4,3	2	2.3	3,46	2,44

Gewichts-% d. zugefugten Mischung	Gas in g/%	Gesamtmenge des Azetons in g/‰	Zugefugtes Azeton in g/‰	Gebildetes Azeton in g/‰	Aziditát	Zucker in %
0	3,5	5,35	0	5,35	3	0,05
1,17	1,8	5,28	2,32	2,9	4	2,1
1,5	1,2	4,18	3	1,18	3,5	3,38
2	0,43	4,3	4	0,3	2,8	5,9

Aus den angeführten Ergebnissen ist ersichtlich, daß in Kulturen des Cl. acetobutylicum neben der Erschöpfung der Nährstoffe die Anhäufung von Butylalkohol während der Gärung die Ursache des Einstellens des Gärungsprozesses sein kann.

Zusammenfassung.

Auf Grund der Resultate aller durchgeführten Versuche über den Einfluß von Azeton und Butylalkohol auf die Azetonbutylgärung kann man folgende Schlüsse ziehen.

1. Das Azeton übt in den Mengen, welche sich bei normalem Verlauf des Prozesses bilden können (0,5—0,7%), fast gar keine Wirkung auf den Gärungsprozeß aus.

2. Beim Zufügen von 2,4% Azeton wird eine gewisse Depression des Gärungsprozesses beobachtet.

3. Im Gegensatz zum Azeton wirkt die Zugabe von Butylalkohol stark hemmend auf die Gärung. Ungefähr 1% Butylalkohol setzt die Gasbildung

auf die Hälfte herab. Ein 1,5% überschreitender Butylalkoholgehalt im Nährboden ruft einen Stillstand der Gärung hervor.

4. Wird Butylalkohol in verschiedenen Mengen bis zu 1,5% während der Gärung zugesetzt, so ist der gärungshemmende Effekt schwächer, wenn die Zugabe in früheren Stunden der Gärung erfolgt, stärker bei späterem Zusatz.

5. Bei Zusatz eines Gemisches aus Butylalkohol und Azeton (3 : 1) hängt der Hemmungseffekt vom Butylalkoholgehalt der Mischung ab.

Nachdruck verboten.

Beiträge zur Biologie von Olpidiopsis saprolegniae Barrett.

[Aus dem Botanischen Institut der Universität Gießen.]

Von **Hermann Diehl**[1].

Mit 23 Abbildungen im Text.

Einleitung.

In den Hyphen von Saprolegnia sind Parasiten keine Seltenheit. Bei den regelmäßig wiederholten Prüfungen wasserbewohnender Pilze, wie sie im Gießener Botanischen Institut mit den Wasserproben des Gartenteichs durchgeführt werden, begegneten mir im Frühjahr 1933 etliche Hyphen von Saprolegnia, die ich als infiziert von Olpidiopsis saprolegniae Barrett erkannte (Fischer 1892, Barrett 1912). Ich begründe diese Bestimmung mit der Feststellung, daß die Gießener Form Dauersporen entwickelte, die mit spitzen Stacheln bewehrt waren; Olpidiopsis saprolegniae A. Fischer (= O. vexans Barrett) trägt statt solcher auf der Dauersporenmembran stumpfe Stacheln. Mit Barrett nahm ich weiterhin das Vorkommen des vorliegenden Parasiten in Saprolegnia zum Anlaß, die dritte ihr so ähnliche Olpidiopsis-Art (O. luxurians Barrett) auszuschließen.

Bei näherer Vertrautheit mit der Lebensweise des Parasiten gelang es ihn und seinen Wirt in Kulturen zu vermehren und mich so für die Beobachtung beider von dem natürlichen Fundort unabhängig zu machen. Den Wirt bestimmte ich als Saprolegnia mixta (nach Rabenhorst).

Olpidiopsis saprolegniae Barrett ist von A. Fischer (1880, S. 689, 705, 725; 1882, S. 286) und Barrett (1912) eingehend beschrieben worden. Gleichwohl schien es lohnend, den Pilz selbst, seine Entwicklung, die Abhängigkeit seiner Gestaltungsprozesse von äußeren Bedingungen und insbesondere seine Wirkung auf den Wirt und dessen lebenden Inhalt zu untersuchen. Die Arbeiten wurden im S.-S. 1933/34 und W.-S. 1934 im Botanischen Institut der Universität Gießen durchgeführt.

Im folgenden sei über die Ergebnisse meiner Untersuchungen berichtet.

[1]) Erschienen als Dissertation der Philosophischen Fakultät der Hessischen Ludwigs-Universität in Gießen.

Der erste Abschnitt soll den Entwicklungsgang des Parasiten schildern, A. Fischers und Barretts Mitteilungen nach Möglichkeit ergänzen und zugleich die Wirkungen verschiedener Nährboden und Kulturbedingungen auf den Entwicklungsgang des Parasiten klarstellen.

Der zweite Abschnitt soll sich mit dem Verhalten des Wirtsorganismus befassen und insbesondere das Schicksal des Protoplasmas kranker Hyphen behandeln.

I. Entwicklung des Parasiten.

Obwohl A. Fischer in seiner Abhandlung den Entwicklungsgang von Olpidiopsis eingehend beschrieben hat, so möchte ich hier kurz den Lebensgang des Parasiten schildern und dabei die chronologische Folge der einzelnen Vorgänge, die bei Fischer nicht luckenlos mitgeteilt sind, zu geben versuchen; überdies weichen manche Einzelheiten meiner Ergebnisse von den Darstellungen Fischers ab.

Nach dem Ausströmen aus einem Sporangium schwärmen die Zoosporen in unregelmäßigen Kurven, ohne sich vorerst um den Wirt zu kümmern. Nach 10—15 Min. bewegen sie sich in unmittelbare Nähe einer Saprolegniahyphe, stoßen an, weichen zuruck, wiederholen dasselbe Spiel und setzen sich endlich an einer Hyphe fest. Ihre längliche, ovale Form wird rundlich. Fast vollig ruhig sitzt nun die Zoospore an ihrem Wirt; bisweilen nur, an einem Punkte festhaftend, bewegt sie sich hin und her. Nach 10—15 Min. gerät die Zoospore wieder in lebhaftere Bewegung. Immer noch festhaftend schiebt sie sich hin und her. Die Bewegung wird stärker, die Zoospore schwingt heftig, schwankt und rüttelt, reißt sich von der Hyphe los und schwimmt davon. Ungefähr 10 Min. schwärmen die Zoosporen wieder umher, bis sie sich zum zweiten Male an den Hyphen festsetzen (Barrett 1912). Sie sind jetzt abgerundet und ruhig und scheinen eine Membran zu haben. 30 bis 50 Min. nach dem ersten Festsetzen der Spore fließt ihr Inhalt durch ein Stielchen in die Wirtshyphe über. Das Überfließen dauert ungefähr 3 Min. Sofort rundet sich der Parasit in dem Wirtsplasma ab. Sehr deutlich ist während des Überfließens, wie später, innerhalb des nackten Plasmaklümpchens, ein dunkles Körnchen zu beobachten, dessen Natur ich nicht zu erläutern vermag; A. Fischer vermutet in ihm den Kern. Von dem lebhaften Plasmastrom der Saprolegniahyphen werden die Parasiten fortgetragen. Sie verändern, wenn auch nur wenig und äußerst langsam, amöboid ihre Form. Die Bewegungsgeschwindigkeit der einzelnen Individuen ist verschieden. Die Hauptbewegungsrichtung weist stets nach der Hyphenspitze. Rückläufige Bewegungen sind selten und geringfügig. Bald nach dem Eindringen ist eine deutliche Größenzunahme zu erkennen. ½ Std. nach der Infektion ist die Volumenzunahme des Parasiten schon sehr deutlich. Die Geschwindigkeit. mit der das Wirtsplasma sie mitführt, nimmt ab. Noch während der nächsten 1½ Std. ist weitere schnelle Volumenzunahme deutlich, die Zoospore hat innerhalb dieser Zeit ihre Substanz ungefähr auf das 4- bis 5fache vermehrt. Später geht die Größenzunahme nur langsam vor sich und ist in hohem Maße abhängig von Größe, Plasmareichtum und Alter der Wirtshyphe, sowie vor allem von der Zahl der eingedrungenen Parasiten. Die Parasiten haben spindelförmige Gestalt und glatte Ränder, sind homogen und stark lichtbrechend. Langsam lagern sich grobe Plasmapartikel des Wirtes an sie. Allmählich verschwinden die Umrisse des Parasiten unter dem sich anlagernden Wirtsplasma. Ebenso wie Barrett (1912) konnte

ich beobachten, daß die Individualität der Zoospore bekannt bleibt, und daß kein Plasmodium zur Ausbildung kommt. 12—15 Std. nach Befall liegt innerhalb der Wirtshyphen ein je nach den Umständen größerer oder kleinerer Plasmaballen aus dichtem, grobkörnigem Material (vgl. Abb. 1). Immer mehr häuft sich das Wirtsplasma um den Parasiten. Nach 16 Std. zeigen die befallenen Hyphen folgendes Bild. In ihnen liegen Parasiten von meist länglich spindelförmiger, oft wurstförmig gebogener Form. Von diesen ziehen lange Plasmastränge durch die Hyphen. Diese sind zunächst noch breit, haben Querverbindungen unter sich und ziehen oft weit in die Hyphen hinein. Die Hyphen zeigen noch keine Anschwellungen (vgl. Abb. 2). Das Zentrum der Plasmaansammlung wird dichter, rundlicher, die zuführenden Plasmastreifen werden schmäler. Ungefähr 30 Std. nach der Infektion tritt an den Hyphen, dort, wo ein Parasit sich befindet, eine Weitung, Ausbuchtung oder Anschwellung auf (vgl. Abb. 3). Das Bild eines 30—40 Std. alten Parasiten ist folgendes: Als dunkler Ballen hebt er sich in dem keulenförmig verbreiterten Ende einer Hyphe oder in dem blasig aufgetriebenen interkalaren Stück einer Hyphe ab. Der Parasit erreicht inzwischen das Stadium des Zoosporangiums. Der Wandbelag der Galle wird immer dünner, gleichzeitig die Kontur des Plasmaballens schärfer. Die Grenze von Wirts- und Parasitenplasma wird deutlicher; es entwickelt sich eine Membran. Der Parasit ist jetzt ungefähr 40 Std. alt (vgl. Abb. 4). Der Plasmabelag der Gallenwand nimmt ab, zugleich der Belag des Parasiten. 3—4 Std. später sind der Plasmabelag der Gallenwand, sowie die Plasmaverbindungsfäden völlig verschwunden. Das Zoosporangium hat eine dicke, stark lichtbrechende Membran. In ihm treten Vakuolen auf; das Zoosporangium steht im Stadium beginnender Reife. An irgendeiner Stelle, oft an mehreren zugleich oder in kurzen Abständen hintereinander, wird eine oder werden mehrere Ausstülpungen gebildet, die zu schlanken Schläuchen auswachsen. Zoosporangium und Schläuche sind mit dichtem, grobkörnigem Plasma erfüllt. Wenn der Schlauch die Gallenwand erreicht und sie durchbrochen hat, hört sein Wachstum auf. In seiner Mitte tritt der ganzen Länge nach ein scharfer, stark gekrümmter Spalt im Protoplasma auf, der sich allmählich erweitert. Es differenziert sich eine Vakuole, die fast ebenso lang wie der Schlauch ist und eine sehr unregelmäßige und stark zerklüftete

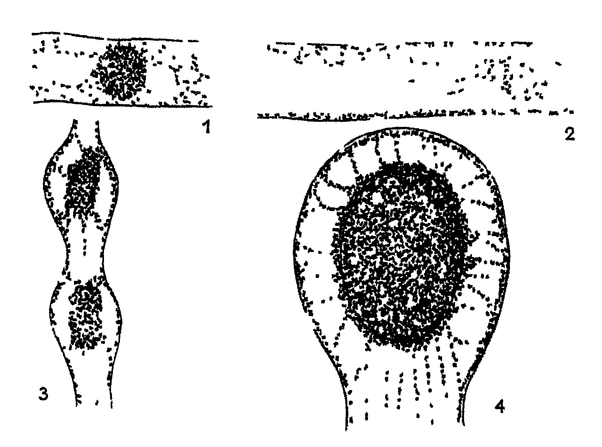


Abb. 1. Ein 12—14 Std. alter Parasit; er ist schon dicht von Wirtsplasma umgeben. — Abb. 2. 16 Std. nach der Infektion; breite Plasmabänder ziehen von dem zentral gelegenen Parasiten zum Wandplasma. — Abb. 3. Dünne und plasmaarme Hyphen bilden 30 Std. nach der Infektion interkalare Anschwellungen aus. — Abb. 4. Ein 40 Std. alter Parasit in einer terminalen Anschwellung; eine Membran hat sich um den Parasiten gebildet; im Innern des heranwachsenden Sporangiums zahlreiche kleine Vakuolen.

Form hat. Der Zoosporangiuminhalt hat sich mittlerweile nicht unerheblich verändert. In dem schmutziggelb gefärbten, grobkörnigen Plasma treten zuerst große Vakuolen auf, die allmählich in eine wachsende Zahl von kleinen Vakuolen sich aufteilen, und diese verschmelzen schließlich zu einer großen, zentralen Vakuole. Die Zerteilung des Protoplasmas schreitet immer weiter vor, bis schließlich der gesamte Inhalt des Zoosporangiums, wie auch der des Entleerungshalses, in eine überaus große Anzahl kleiner Partikel zerfällt. Ihre Form ist unregelmäßig rundlich; sie sind nackte, starker Formveränderung ausgesetzte Plasmaklümpchen. An irgendeinem Punkte geraten sie in eine lebhafte Bewegung, die sich auf den gesamten Inhalt des Zoosporangiums ausdehnt. Es herrscht ein großes Gedränge: Zoosporangium und Entleerungsschläuche wimmeln von Zoosporen. Oft schon nach einer halben Stunde, nicht selten aber länger, sogar 2—3 Std. nach der Bildung der Entleerungsschläuche, zerreißt die Spitze eines Schlauches. Mit Energie und großer Geschwindigkeit strömen die Zoosporen heraus. Nach 30 Min. ist der größte Teil der Zoosporen ausgeschlüpft. Die Zoosporen im Sporangium sind in ständiger kreisender Bewegung; kommt der eine oder andere dem Entleerungshalse nahe, so schlüpft er hinaus. Oft wird er im Entleerungshalse nochmals aufgehalten, kehrt um, schlüpft in das Sporangium zurück und wandert in dem kreisenden Strome wieder mit. Selbst Zoosporen, die schon außerhalb des Entleerungshalses waren, kehren manchmal in das Sporangium zurück. Meist ist das Zoosporangium 1 Std. nach Öffnung des Entleerungshalses völlig entleert.

Über die Zytologie des Zoosporangiums und insbesondere das Verhalten seines „Zytoms" hat Varitchak (1931) berichtet. Eigene Untersuchungen über die Beteiligung der Kerne und Mikrosome bei der Zoosporenbildung habe ich nicht angestellt.

Die Entwicklung des Parasiten ist nicht in allen Phasen unbedingt an den Wirtsorganismus gebunden. Durch vorsichtiges Zerdrücken infizierter Saprolegniakulturen gelang es Parasiten aus den Hyphen heraus zu isolieren. Diese Parasiten wurden in Leitungswasser gebracht, dem etwas Agar zugesetzt worden war. Diese isolierten Individuen hatten teils schon eine Membran gebildet, teils fehlte eine solche noch. Nach ungefähr 24 Std. hatten sie eine kräftige Membran und einen Entleerungshals gebildet. Der Inhalt war in Sporen zerfallen, die durch den Entleerungsschlauch ausschwärmten. Der Parasit ist demnach nur in der ersten Entwicklungszeit unbedingt an den Wirt gebunden; isolierte Zoosporen entwickeln sich nicht. Spätere Entwicklungsstadien können auch außerhalb des Wirtes zur Reife gebracht werden.

Über die Lage des Parasiten im Wirtsprotoplasten kann man sich nicht in allen seinen Entwicklungsphasen und in allen Präparaten zuverlässig informieren. Daß die heranreifenden Zoosporangien von einer derben Wirtsprotoplasmaschicht umgeben sind und von einem System von Plasmafäden umstrahlt werden, ist leicht und an sehr zahlreichen Objekten zu bestätigen. Schwieriger ist die Feststellung, welche Lage die stäbchen- oder wurstförmigen Stadien des Parasiten in der Zelle einnehmen. Wiederholt gelang es mir, infizierte Hyphen von besonders kräftiger Plasmaausstattung zu untersuchen, in welchen sehr derbe Plasmabelege zu sehen waren, und die Parasiten wie mit abgemessener Genauigkeit den Zellsaftzylinder der Hyphe in Anspruch nahmen und geradezu blockierten, ohne daß die Mächtigkeit des Plasmabelags von ihm beeinflußt wurde. In manchen solcher Hyphen

habe ich aber zugleich gesehen, daß dort, wo ein in breitem Lumen liegender Parasit schief zur Langsachse der Zelle orientiert im Zellsaftraum lag, eine feine, aber zuverlassig erkennbare Plasmaschicht ihn umspannte. Es laßt sich vermuten, daß eine solche auch dann vorhanden ist, wenn sie das Mikroskop nicht mehr zu zeigen vermag. — Ob auch sehr jugendliche Stadien des Parasiten standig eine solche Hulle haben, oder ob sie wenigstens zeitweilig im Zellsaftraum liegen konnen, wage ich nicht zu entscheiden.

Eine zuverlassige Bestimmung des vorliegenden Parasiten wurde erst moglich, als es gelang, ihn zur Bildung von Dauersporangien zu veranlassen.

Stark befallene Saprolegniakulturen wurden im Winter in kuhlen Raumen sich selbst uberlassen (Barrett 1912). Nach 14 Tagen konnten in den Kulturen reichlich Dauersporangien festgestellt werden. Neben Gallen mit Dauerzysten wurden noch reichlich solche mit glatten Sporangien gefunden Man erkennt die Dauerzysten an den Stacheln ihrer Membran; A. Fischer (1880) spricht von „Stachelkugeln". Die Große der Zysten blieb im Durchschnitt erheblich hinter der der glatten Sporangien zuruck. Stets hatten die Zysten eine „Anhangszelle" (Cornu 1872, S. 145), in seltenen Fallen wurden 2—3 Anhangszellen an einer Zyste gefunden (vgl. Abb. 5). Die Anhangszellen waren zum großten Teil vollig leer. Sie waren fest mit der Dauerzyste verbunden. Durch Drucken und Verschieben des Deckglases konnten beide nicht voneinander getrennt oder gegeneinander verschoben werden.

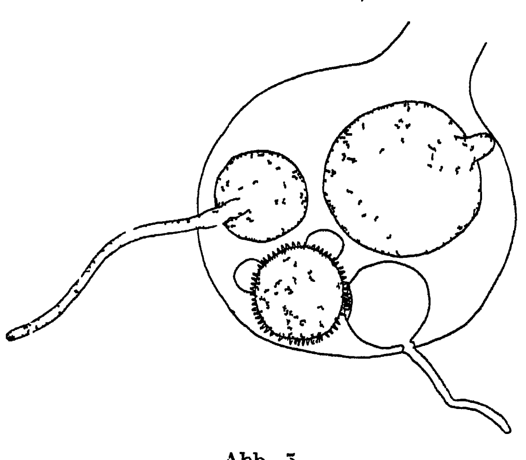


Abb. 5.

Verschiedene Stadien der Entwicklung von Anhangszelle und Dauerzyste konnten von mir beobachtet werden. Barrett (1912) hat die Entwicklung der letzteren eingehend beschrieben. Ich werde mich daher nur auf Mitteilung besonderer Einzelheiten meiner Beobachtungen beschranken. Zu Beginn ihrer Entwicklung weisen anscheinend Antheridium und Oogonium oft keine besonderen Großenunterschiede auf. In einem der von mir beobachteten Falle waren beide fast gleich groß. Die Stacheln der Zyste werden schon sehr fruhzeitig gebildet. Wahrend des Sexualvorganges sind Antheridium und Oogonium durch eine breite Brucke miteinander verbunden. Ob mit dieser Brucke eine offene Verbindung vorliegt, konnte nicht einwandfrei festgestellt werden. Sicher ist, daß das Antheridium hier keine deutliche Membran zeigt. Das Protoplasma des Antheridiums zerfällt in eine große Anzahl von Kugeln von oliger oder fettiger Beschaffenheit; das des Oogoniums ist dicht und feinkornig.

Die Stachelkugeln liegen entweder einzeln oder zu wenigen (2—3) in einer Galle. Großere Anhäufungen scheinen nicht vorzukommen.

Häufig findet man, daß Zysten und glatte Sporangien in einer Galle zusammenliegen. Die Zahlenverhältnisse wechseln; ich zählte in einer Galle

3 Stachelkugeln neben 4 glatten Sporangien, in einer anderen 2 neben 6, und in einer 3. Galle fand ich eine Zyste neben 3 glatten Sporangien.

Die Größe der Zysten wechselt. In manchen Fällen sind sie größer als die glatten Sporangien; diese haben alsdann oft nur die Größe der Anhangszellen. In anderen Fällen können die glatten Sporangien gleich groß oder sogar beträchtlich größer sein als die Zysten; so wurden in einer Galle, die eine Zyste und 3 Sporangien enthielt, folgende Größen festgestellt: Ein Sporangium war so groß wie die Zyste, das zweite hatte den doppelten und das dritte den 3 fachen Durchmesser der Zyste.

Die Sporangien treiben Entleerungsschläuche und vollenden normal ihren Entwicklungsgang. Auffallend ist, daß bei allen Zoosporangien, die zusammen mit Dauersporangien in derselben Galle lagen, der Entleerungsschlauch außerordentlich breit angelegt wird und eine beträchtliche Länge erreichen kann.

Die mit anderen parasitisch lebenden Pilzen gemachten Erfahrungen lassen es nicht als aussichtsreich erscheinen, Olpidiopsis ohne Wirt als Saprophyten auf totem Material zu züchten. Zu erwägen war aber, ob vielleicht bestimmte Phasen des Parasiten saprophytischer Kultur zugänglich wären, und ob durch Kultur infizierter Saprolegnia-Hyphen in künstlichem Substrat auch der Parasit zu besonderen Wachstumsleistungen gezwungen werden könnte, welche Beachtung verdienen.

Ich verfuhr in der Weise, daß ich gutwachsende infizierte Hyphen auf Agar-Agar übertrug, und versuchte weiterhin durch Darbietung von Zuckerlösung die Entwicklung des Pilzes zu beeinflussen.

Über die beiden Versuchsserien ist folgendes zu berichten.

Ameiseneier, die mit jungem, schon infiziertem Saprolegnia-Myzel bewachsen sind, taucht man in eben erhärtenden Agar. Die Saprolegniahyphen, gesunde wie infizierte, wachsen in dem festen Medium schneller als die Bakterien. Durch niedrige Temperaturen wird die Entwicklung der Bakterien gehemmt. Man erreicht dann in den meisten Fällen, trotz der groben Arbeitsweise, daß ein Großteil der Olpidiopsis-Zoosporangien sich in halbwegs bakterienfreiem Agar entwickeln kann.

Benutzt wurden 1 und 2% Agar, teils mit, teils ohne Peptonzusatz.

Während der Entwicklung in Agar treten sowohl zeitlich als auch morphologisch keine Abweichungen gegenüber der Entwicklung in Wasser auf. Bei der Reifung der Zoosporangien sind die beschriebenen Veränderungen des Plasmas und der Vakuolen nicht immer zu beobachten. In vielen Fällen, besonders bei kleinen Zoosporangien, tritt überhaupt keine Zerklüftung des Protoplasmas in Zoosporen ein. Die Zoosporangien bilden oft Entleerungsschläuche, ohne daß schwärmfähige Zoosporen vorhanden sind, oder auch nur deren Bildung eingeleitet wäre. Am auffallendsten ist die Form, welche die Entleerungshälse auf unserem künstlichen Substrat annehmen. Während normalerweise die Entleerungsschläuche kurz bleiben und unmittelbar vor der Entleerung angelegt werden, wachsen sie in Agarkulturen zu überraschender Länge heran (vgl. Fig. 6—9). Ihr Wachstum hält viele Stunden an. In Wasserkulturen beträgt die Zahl der Schläuche eines Zoosporangiums durchweg 2—3: in Agarkulturen ungleich mehr. Ihre Zahl ist der Größe des Zoosporangiums entsprechend unterschiedlich. Bei größeren Sporangien beträgt sie im Mittel 6—7. Während sie heranwachsen, entstehen stets noch neue aus dem Sporangium. Z. B. hatte am 1. Aug. 10.40 Uhr ein Sporan-

gium 2 Entleerungsschläuche von 136.5 μ bzw. 127,4 μ Länge; bis 17.30 Uhr waren 6 Schläuche gebildet worden und die ersten mittlerweile auf 216 μ bzw. 207 μ angewachsen.

Will man die Sporangien zur Bildung langer Schläuche kommen sehen, so müssen sie sich bereits einige Zeit in dem Agar befinden bzw. sich in ihm entwickelt haben. Bringt man verhältnismäßig große und schon mit einer Membran versehene Parasiten in den Agar, also Parasiten, die etwa 24 Std. später normalerweise zur Entleerung gekommen wären, so werden keine langen Schläuche gebildet, sondern nur normale kurze.

Noch größer werden die langen Schläuche bei Sporangien der 2. Generation innerhalb einer Agarkultur, d. h. nach Infektion der Wirte mit Zoosporenmaterial, das bereits in Agarkulturen entstanden war.

Die Länge der Schläuche ist verschieden und wechselt mit der Größe des Sporangiums. Die größte absolute Länge wurde mit 567 μ gemessen (Durchmesser des Sporangiums 90 μ). Auch die Länge der Schläuche eines und desselben Sporangiums ist verschieden. Stets beträgt jedoch die Länge des Schlauches ein Vielfaches des Sporangiumdurchmessers. Bei einem Sporangium von 90 μ Durchmesser betrug die Gesamtlänge seiner vielen Schläuche zusammen 2088 μ (vgl. Abb. 7).

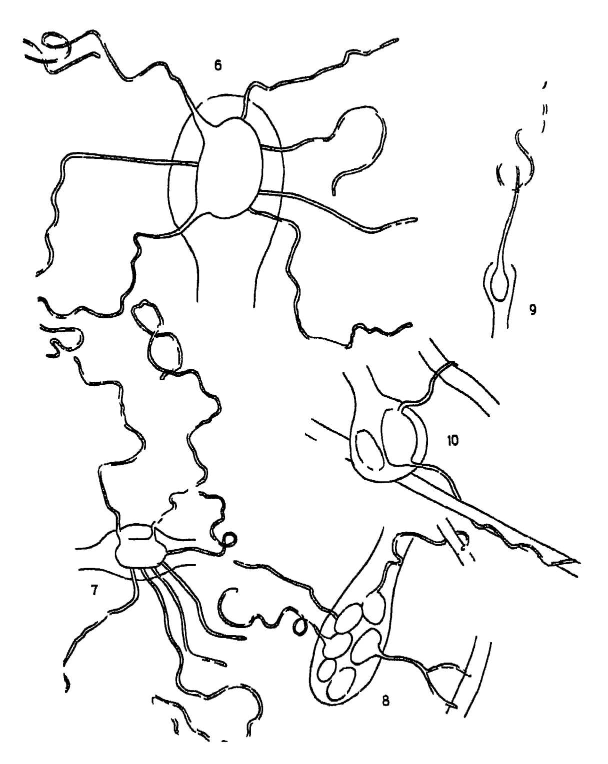


Abb. 6 u. 9. Kulturen in Agar. Die Entleerungsschläuche sind sehr lang und außerordentlich stark gewunden. — Abb. 7. Das Sporangium hat einen Durchmesser von 90 μ; die Länge der Entleerungsschläuche zusammen beträgt 2088 μ. — Abb. 8. Verzweigter Entleerungsschlauch. — Abb. 10. Nachbarhyphen werden von Entleerungsschläuchen umwachsen.

Die Auswuchsstelle der Schläuche aus dem Sporangium ist breit und trichterförmig. Der Trichter verjüngt sich rasch, die Schläuche sind dann schmal und nehmen an Breite nur unmerklich bis zur Spitze hin ab. Ihre Breite ist sehr regelmäßig, es treten keine Ausbuchtungen oder Verdickungen auf. Sie wachsen nur selten in gerader Richtung, sind vielmehr in allen Richtungen des Raumes stark gekrümmt. Besonders an den Enden bilden sich oft Schlingen und Spiralen, oder sie biegen um und wachsen wieder rückwärts; sie durchwuchern in allen Richtungen den Agar. Selten treten Verzweigungen auf (vgl. Abb. 8).

Barrett (1912. S. 219, Taf. XXIII, 20) beobachtete in sehr seltenen Fallen an Olpidiopsis vexans mehrere Entleerungsschläuche, die lang auswuchsen und deren Enden „eigentumlich" aufgewickelt waren. Die Membran des Wirtes wurde hierbei von den Entleerungsschlauchen nicht durchbrochen.

Ob ihre Richtung durch irgendeinen Faktor beeinflußt wird konnte nicht eindeutig festgestellt werden. Manchmal endigen die Schläuche an oder auf einer Nachbarhyphe. In einigen Fällen umwuchs der Entleerungsschlauch eine Nachbarhyphe; vielleicht liegen die bei Pilzfäden so oft zur Geltung kommenden thigmotropistischen Wirkungen vor (vgl. Abb. 10). Anderseits konnte in vielen Fällen festgestellt werden, daß Nachbarhyphen keinen Einfluß auf die Wachstumsrichtung ausübten. Versuche an wachsenden Schläuchen. durch künstliche Mittel (Pepton, Diastase, Kartoffelgewebe usw.) einen Chemotropismus nachzuweisen, verliefen negativ.

Wie schon erwähnt, treten bei dem Reifungsprozeß der Sporangien, gegenüber dem normalen Verlauf, Abweichungen auf. Je nach Größe der Sporangien und der Länge der gebildeten Schläuche sind die Verhältnisse verschieden.

Bei größeren Sporangien tritt im allgemeinen noch eine Zerklüftung des Inhalts in Sporen ein. Auch der Inhalt der Schläuche zerfällt in solche. Schläuche von ungefähr 360 und mehr μ Länge und stark gewundener Form bringen sie nicht zur Entleerung. Hat ein Sporangium außer langen Schläuchen auch einige kürzere entwickelt, so kann der Inhalt durch diese entleert werden. Tritt eine Öffnung der Schläuche nicht ein, so bewegen sich die Sporen lebhaft innerhalb des Sporangiums, ohne es jemals verlassen zu können. In den Schläuchen ist dann ungefähr im unteren Drittel ebenfalls lebhafte Bewegung der Sporen zu beobachten, während in den oberen zwei Dritteln der Inhalt deutlich in Sporen differenziert ist, diese jedoch unbeweglich bleiben. Die Bewegungsenergie der Sporen nimmt nach etwa 1 Std. erheblich ab; es tritt schließlich Stillstand ein, der Inhalt geht zugrunde. In vielen Sporangien tritt überhaupt keine Differenzierung des Plasmas ein, besonders bei kleineren; das Sporangium ist dann von einer großen zentralen Vakuole erfüllt, das Plasma auf einen dünnen Wandbelag beschränkt. Die Schläuche sind dicht mit Plasma erfüllt. Der Inhalt des Sporangiums scheint fast restlos in die Schläuche gewandert zu sein.

Das wichtigste Ergebnis unserer Agarversuche scheint zu sein, daß man durch diese die in natürlichem Substrat kurzen und unscheinbar bleibenden Produkte der Zoosporangien zu Gebilden heranwachsen lassen kann, die als Hyphen bezeichnet zu werden verdienen. Diese Feststellung mußte überraschen, da bei sehr vielen Archimyzeten und insbesondere bei der uns vorliegenden Parasitenform im natürlichen Substrat keine Myzelbildung auftritt.

Zystenbildung habe ich in Agarkulturen niemals beobachten können, so daß ich über die Frage, welche Bedingungen über die Bildung von Zysten und die von Zoosporangien entscheiden, keine Auskunft geben kann. Unser Befund, daß in einer Galle nebeneinander Zysten und Zoosporangien auftreten können, läßt mit der Möglichkeit rechnen, daß schon durch sehr geringe Unterschiede in der Beeinflussung durch die Außenwelt die eine Bildungsform die andere zu ersetzen vermag.

Über den Einfluß zuckerhaltiger Nährlösungen kann ich mit großer Kürze berichten, da der wesentliche Erfolg der Zuckerbehandlung in einer Hemmung der Entwicklung des Parasiten besteht.

Ich verwendete Rohrzuckerlosungen verschiedener Konzentration

Bereits in 1proz Rohrzuckerlosung macht sich starke Hemmung in der Entwicklung der Gallen und Parasiten bemerkbar Nach 5 Tagen ist noch keine Entleerung der Zoosporangien eingetreten

In 5proz. Rohrzuckerlosung sind die Parasiten schwach entwickelt, die Gallen zeigen oft abnorme Formen Galle und Parasit stehen nicht mehr in normalem Verhaltnis zueinander, vielmehr sind die Parasiten auffallend klein Nach 5 Tagen war noch keine Entleerung festzustellen.

In 10proz. Rohrzuckerlosung wachsen die Gallen noch stattlich heran die Parasiten bleiben klein, nach 5 Tagen scheinen sie noch keine Membran zu haben

In 15proz Rohrzuckerlosung sind auch die Gallen schwach entwickelt, nach 5 Tagen scheint die Mehrzahl der Parasiten tot zu sein

In 20proz Rohrzuckerlosung sind nur geringe Ansatze zur Gallenbildung erkennbar Die Entwicklung des Parasiten ist stehengeblieben, viele sind plasmolysiert.

In 34proz. Rohrzuckerlosung ist keine Entwicklung mehr zu konstatieren doch bleiben die Parasiten am Leben. Bringt man die Myzelproben nach 48 Std. aus der Rohrzuckerlosung in Leitungswasser, so bilden die Parasiten Gallen, allerdings nur sehr klein, die Zoosporangien reifen und kommen zur Entleerung

II. Das Verhalten des Wirtsorganismus.

Das zuverlassige und sinnfalligste Zeichen des erfolgreichen Befalls einer Saprolegniakultur durch Olpidiopsis saprolegniae ist die Bildung von Anschwellungen, bauchigen Ausweitungen — interkalaren und terminalen — der Hyphen. Nach Kusters Definition (Kuster 1911) sind diese Gebilde als Gallen zu bezeichnen, da die Anschwellungen unter dem Einfluß des Parasiten erzeugt werden und mit diesem in ernährungsphysiologischer Beziehung stehen.

Die meisten Gallen sind endstandig: Entweder schwillt eine Hyphe allmahlich zu einer Keule oder Spindel an, oder sie verbreitert sich an ihrem Ende plotzlich zu einer Blase, die in vielen Fallen zu einer wohlgerundeten Kugel werden kann. Seltener sind die Gallen interkalar. Sie werden es entweder dadurch, daß eine endstandige Galle auswachst, oder sie kommen durch Ausweitung einer interkalaren Hyphenstrecke zustande, indem die Membran starkes tangentiales Wachstum erfahrt und zu einer Spindel anschwillt.

Ich befinde mich mit einer solchen Feststellung interkalaren Wachstums und meiner Erklarung im Widerspruch zu dem, was nach Reinhardts (1899) gewissenhaften Beobachtungen fur das Wachstum der Pilzhyphen gilt. Ich glaube aber doch trotz Reinhardts Autoritat an der Auffassung von der interkalaren Entstehung der Gallen festhalten zu sollen. Nehmen wir mit Reinhardt an, daß anomale Erweiterungen der Hyphen nur an den wachsenden Spitzen zustande kommen konnten, so mußten wir annehmen, daß eine zweimalige und dreimalige Infektion des Hyphenmaterials stattgefunden hatte, und daß die aufeinanderfolgenden Infektionen zeitlich so weit auseinander lagen, daß jedesmal fur das Auswachsen einer Galle und fur erneutes Langenwachstum Zeit bliebe — oder man mußte annehmen, daß eine Zelle auswächst, und ein Teil ihrer Parasiten die neue Strecke durchwandert und an der Spitze die Bildung einer neuen Galle anregt. Gegen solche Annahmen spricht aber der Ablauf unserer Infektionsversuche, bei welchen nur einmal dem Hyphenmaterial Zoosporen zugefuhrt wurden, und ebenso spricht dagegen der Befund, daß in den stockwerkweise ubereinanderliegenden Gallen Parasiten von gleichem Alter und Entwicklungsstufen lagen. Schließlich gelang es mir auch, infizierte Hyphen von normaler zylindrischer Form an den Stellen sich erweitern zu sehen, an welchen Parasiten lagen.

Nach Erwägung dieser Umstände muß ich folgern, daß auch ausgewachsene Hyphenzellen zu Gallen werden und durch tangentiales Wachstum Membranerweiterungen bilden können, die im wesentlichen den apikalen Gallen gleichen.

Ungleich häufiger als die interkalaren Gallen sind die terminalen. In sehr vielen Kulturen sucht man nach interkalaren Gallen durchaus umsonst. Niemals habe ich Kulturen beobachtet, in welchen nur interkalare Gallen zu sehen gewesen wären. Welche Umstände die Entstehung von interkalaren Gallen an Stelle von terminalen hervorrufen, wird später zu erörtern sein.

Die ersten Anzeichen eines durch den Parasiten beeinflußten Wachstums sind an den besiedelten Hyphen früh zu erkennen; zwar behalten diese zunächst noch ihre normale Form, aber sie unterscheiden sich von gesunden und nichtinfizierten Hyphen dadurch, daß sie erheblich breiter werden als die normalen, im Längenwachstum hinter ihnen zurückbleiben und mit körnigem Protoplasma so dicht erfullt sind, wie es bei den normalen nicht angetroffen wird. Die Breite der infizierten Hyphen verhält sich zu der der normalen wie 3 : 1.

Wie die Form variiert auch die Größe der Gallen von nahezu stecknadelkopfgroßen Riesen bis zu mikroskopisch kleinen, nur wenige Mikron in Länge und Breite messenden Zwergen.

Charakteristisch für die durch Olpidiopsis saprolegniae hervorgerufene Gallenbildung ist, daß niemals die Galle durch irgendeine Querwand von dem übrigen Teil der Hyphe abgeschnürt wird. Dieser negative Befund bekommt dadurch besonderes Interesse, daß bei der Bildung der geschlechtlichen und ungeschlechtlichen Fortpflanzungsorgane des Pilzes einige Abschnitte ein Sonderschicksal hinsichtlich ihrer Entwicklung erfahren, indem sie eine Querwand bilden und sich durch sie von dem übrigen Myzel trennen. Daß dem Protoplasma der Gallen die Fähigkeit zur Membranbildung nicht abgeht, zeigen einige Fälle, bei welchen bei Verletzungen, nach lokaler Nekrose oder nach Plasmolyse eine Wand gebildet wird.

Chemisch zeigen die Gallen keine Besonderheiten; ihre Wände geben, wie schon A. Fischer (1880) nachgewiesen hat, die üblichen Zellulosereaktionen.

Das Wachstum der Gallen vollzieht sich in ziemlich kurzer Zeit und geht Hand in Hand mit der Entwicklung des Parasiten. Die Bildung der erwähnten blasigen Erweiterungen der infizierten Hyphen beginnt dann, wenn im Innern der Hyphen die Differenzierung von Protoplasmafäden sichtbar wird. Die Zeitdauer, deren die Gallen zu ihrer Fertigstellung benötigen, schwankt innerhalb weiter Grenzen, weil Größe und Entwicklungsgeschwindigkeit des Parasiten von den Ernährungsbedingungen abhängen und so auch die der Gallen. Schlecht ernährte Hyphen bilden fast um jeden Parasiten eine kleine Galle. In 3—4 Std. haben sich diese Gallen zu ihrer endgültigen Größe entwickelt, die Hyphen haben dann ein knotiges Aussehen; es liegen hier die obenerwähnten interkalaren Gallen vor. Kräftige Hyphen mit meist endständiger Anschwellung benötigen ca. 5—10 Std. Noch längere Zeit beanspruchen solche, in denen der oder die Parasiten, trotz ansehnlicher Größe, noch lebhafte Ortsverlagerungen durchmachen. Die Gallenbildung kann durch solche Lagenveränderungen stark beeinflußt werden; es kann zur Bildung einer oder mehrerer Ausbauchungen kommen, und jede von diesen kann Parasiten beherbergen. Die auf diese Weise entstandenen

Gallenformen zeigen wohl das Bild interkalarer Gallen, aber den Reinhardtschen Wachstumsgesetzen ungefähr entsprechen (vgl. Abb. 11—13). —

Die Wanderung des Parasiten innerhalb der Wirtshyphe und die durch sie bedingte Beziehung zwischen Parasit und Gallenbildung ist in der bis jetzt vorliegenden Literatur wenig behandelt worden. Barrett (1912, S. 217) glaubt die Fälle, wo mehrere Parasiten in einer Galle liegen, durch die Annahme erklären zu können, daß die jungen Parasiten auf diesen Punkt hinwanderten. Ich war wiederholt in der Lage, mich von den erheblichen Wanderungen zu überzeugen, die der Parasit in den infizierten Hyphen zurücklegen kann.

Durch eingehende Beobachtungen und Messungen konnte ich feststellen, daß die Ortsverlagerung der Parasiten nicht ausschließlich durch die von den normalen Hyphen her bekannte Plasmaströmung bedingt wird. In kräftigen, plasmareichen Hyphen befindet sich der Parasit solange in Bewegung, als noch Plasma innerhalb der Hyphe ist. Freilich nimmt die Bewegungsenergie mit der zunehmenden Größe der Galle und der damit verbundenen Abnahme des Wirtsplasmas ab. Nur in seinen ersten Jugendstadien ist der Parasit ausschließlich von der jeweiligen Plasmaströmung abhängig. Aktive Bewegung kommt ihm offenbar nicht zu, wenn auch in frühen Phasen der Entwicklung amöboide Formveränderungen an ihm erkennbar sind. Wenn der Parasit seine typische Spindelform erreicht hat, beginnt das Plasma des Wirtes unter seinem Einfluß ihn in bestimmter Richtung zu treiben. In diesem Entwicklungsstadium hört im allgemeinen das Längenwachstum der Hyphe auf oder wird doch sehr verlangsamt. Der Plasmastrom hat seine bevorzugte Richtung nicht mehr zur Hyphenspitze, sondern auf den Parasiten selbst hin.

Wir können zwei Typen der Gallenbildung unterscheiden. Bei dem ersten ist eine Hyphe nur von einem einzigen Parasiten in Anspruch genommen; bei dem anderen von vielen. Im ersten Falle verläuft die Entwicklung meist folgendermaßen: Wird eine junge, kräftige Hyphe infiziert, so führt die Hauptströmungsrichtung des Protoplasmas den Parasiten bis zur Spitze. Auf dieser Wanderung nimmt er ständig zu. Bei sehr kräftigen, schon sehr früh infizierten Hyphen erreicht der Parasit die Spitze, ohne daß eine Plasmaverringerung in der Wirtshyphe festzustellen wäre; sie ist noch dicht und gleichmäßig mit körnigem Protoplasma erfüllt. Der Parasit wächst jetzt rasch heran, und die Gallenbildung beginnt. Das Plasma fließt allmählich in die sich vergrößernde Galle, und die Entwicklung vollzieht sich wie wir es beschrieben haben. In weniger kräftigen Hyphen tritt oft schon, bevor der Parasit bis zur Spitze gelangt ist, leichte Anschwellung der Wirtshyphen um den jeweiligen Standort des Parasiten ein. Jedoch in den meisten Fällen wandert er stetig weiter zur Spitze und verläßt die schon gebildeten Gallenanfänge wieder. Seine Bewegung ist in diesen Fällen äußerst langsam.

In sehr schwachen, plasmaarmen Hyphen findet keine größere Ortsverlagerung des Parasiten statt. In ihnen setzt er sich frühzeitig fest; die Gallenbildung setzt früh ein.

Auch kann sich, allerdings in seltenen Fällen, schon eine Anschwellung bilden, ohne einen unmittelbaren Anreiz durch einen an der zur Anschwellung sich anschickenden Hyphenstelle liegenden Parasiten erhalten zu haben. Meist jedoch befindet sich der Parasit in unmittelbarer Nähe. — Sind mehrere bis viele Parasiten in einer Hyphe, so müssen wir bei Schilderung der Gallen-

entwicklung wieder die wechselnde Konstitution der infizierten Hyphen beachten.

Kräftige, plasmaerfüllte und frühzeitig infizierte Hyphen haben endständige Gallen, in denen meist sämtliche eingedrungenen Parasiten vollzählig zusammengeschwemmt sind (vgl. Abb. 14—17). Weniger plasmareiche und etwas ältere Hyphen bilden zuerst interkalare Gallen, die dadurch zu endständigen werden, daß das über ihnen liegende schlanke Hyphenende sich stark verbreitert (Abb. 18—21). Schwache, plasmaarme Hyphen bilden viele interkalare Gallen mit jeweils nur einem oder nur wenigen Parasiten.

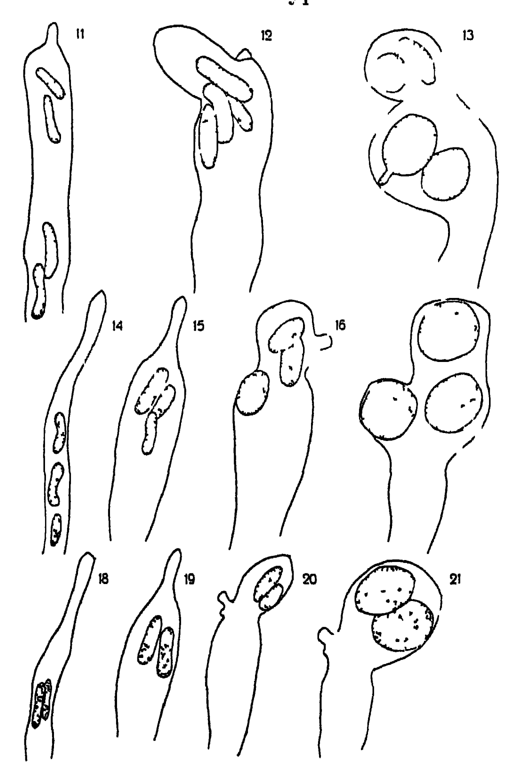


Abb. 11. Wanderung des Parasiten in der Wirtshyphe und dadurch bedingte Gallenbildung. Galle mit vier jungen Parasiten am 6. Juli 15.30 Uhr. — Abb. 12. Dieselbe Galle 2 Std. 15 Min. später. — Abb. 13. Dieselbe Galle nach weiteren 18 Std. 15 Min. — Abb. 14—17. Wanderung des Parasiten und Gallenbildung innerhalb einer Zeit von 19 Std. 30 Min. — Abb. 18. Hyphe mit zwei Parasiten am 13. Juli 13 Uhr. — Abb. 19. Dieselbe am 13. Juli 16 Uhr. — Abb. 20. Dieselbe am 13. Juli 18.30 Uhr. — Abb. 21. Dieselbe am 14. Juli 8.30 Uhr.

Gerade bei Hyphen mit starkem Befall können wir die „Zielstrebigkeit“ der Parasitenwanderung gut beobachten. Hat ein Parasit sich irgendwo in der Hyphe festgesetzt, und beginnt eine Galle sich zu bilden, so setzt mit dem Einströmen des Protoplasmas in diese auch eine Einwanderung der übrigen Parasiten ein. So werden bei genügendem Plasmavorrat alle Parasiten vollzählig in einer einzigen Galle zusammengeschwemmt. —

Die Größe der Gallen ist weitgehend abhängig von dem Plasmareichtum der betreffenden Hyphe. Eine große Rolle spielt dabei ferner die Zahl der in ihr hausenden Parasiten. Die größten Gallen enthalten durchschnittlich nicht mehr als 1—2 Parasiten. Gallen, die mehrere bis viele enthalten, sind im allgemeinen kleiner. Die Parasiten nehmen offenbar das vorhandene Wirtsplasma auf; je mehr Parasiten die Galle füllen, desto stärker ist der Plasmaverbrauch; für den einzelnen Parasiten freilich mindert sich der Stoffverbrauch. Je mehr Individuen in einer Galle sind, desto kleiner wird also das Volumen der einzelnen, jedoch bedingt der gesteigerte Plasmaverbrauch im gesamten, daß die Größenentwicklung der Gallen beschränkt bleibt.

Die Entwicklungsdauer des Parasiten ist nicht nur von äußeren Faktoren wie Temperatur und Substrat abhängig, sondern auch von der Beziehung zwischen Parasit und Wirt. Hier kommt es darauf an, wie groß die Plasma-

menge ist, die der Wirt dem Parasiten zur Verfügung stellt. In Gallen, in denen mehrere Parasiten leben, reifen diese viel schneller als in Gallen mit nur einem Insassen. Je mehr Wirtsplasma der Parasit zur Verfügung hat, desto großer wird er. und desto längere Zeit benötigt er zu seiner Entwicklung. Nach Fischer (1882) steht die Größe der Sporangien einer Galle in umgekehrtem Verhältnis zu ihrer Anzahl. In manchen Fällen fand ich Gallen, die Parasiten enthielten, deren Größenverhältnisse außerordentlich verschieden waren. Besonders an Präparaten. die nach Flemmings Dreifarbenverfahren behandelt waren, konnte ich solche Erscheinungen deutlich beobachten. Neben großen, reifen Sporangien befanden sich winzige Zoosporen, die ungefähr der Größe eines 5—6 Std. alten Parasiten entsprachen. Die Größenverhältnisse dieser kleinen Parasiten unter sich waren nicht übereinstimmend, sondern schwankten erheblich. Ob es sich hierbei um junge Stadien späterer Infektion oder um Degenerationsstadien der ersten Infektion handelt, kann ich nicht entscheiden.

Auch durch verschiedenartige Ernährung der Wirtshyphen läßt sich die Entwicklung der Gallen beeinflussen.

Schneiden wir infizierte Myzelstücke von ihrem Substrat ab und bringen sie in Leitungswasser, so bilden sie entweder keine Gallen oder nur schwache Anschwellungen. Vor der Operation schon gebildete Gallen vergrößern sich nicht mehr, die Parasiten selbst nehmen kaum an Größe zu, sondern reifen zu Sporangien. Infizierte Hyphen, die zu kurz abgeschnitten wurden, sterben ab. In den anderen entwickelt sich ein Teil der Parasiten zu reifen, entleerungsfähigen Sporangien. Andere setzen ihre Entwicklung nur bis zu bestimmten Stadien fort. So bilden einige noch Entleerungsschläuche, aber entleeren sich nicht mehr, andere bleiben kurz vor der Bildung von Entleerungsschläuchen stehen, noch andere sind schon vor diesen Stadien abgestorben.

Legen wir die abgeschnittenen Hyphen in eine Peptonlösung, so bildet ein großer Teil von ihnen Gallen aus. Alle, auch kleine Stücke infizierter Myzelfäden, bleiben leben. Fast alle Parasitensporangien. zumindest beträchtlich mehr als in Leitungswasser, gelangen zu Reife und Entleerung.

Vergleichen wir die von unserem Pilz erzeugten Gallen mit den komplizierten vielzelligen Gebilden, die wir an hoheren Pflanzen als Gallen bezeichnen, so finden wir an den von uns beschriebenen Gebilden manche Vorgänge, die beim Studium der Gallen höherer Pflanzen wiederholt diskutiert worden sind, in besonders einfacher Form wieder. Beim Vergleich dieser und jener Gallenformen niederer und höherer Gallenwirte werden wir freilich nie übersehen dürfen, daß die Gallen der Saprolegnia keine spezifisch geformten Gebilde sind. In der Gestalt gleichen sie nicht nur manchen Produkten der normalen Zytogenese des Wirts, sondern auch pathologischen Bildungen, die man durch Insulte verschiedenster Art an den Saprolegniahyphen erzeugen kann (Küster 1925).

Wenn oben davon die Rede war, daß der Parasit interkalare Schwellungen bei den Hyphen des Wirtes veranlaßt, diese aber später vom Parasit verlassen werden, so haben wir in solchen „unfertig" gebliebenen Gallen Analoga zu den „verlassenen Gallen" der Zezidologie vor uns. Bei diesen wie bei jenen Gebilden findet anomales Wachstum nur dann und nur solange statt, wie der Parasit zur Stelle ist; wenn er die jungen. unfertigen Gallen verläßt, so bleibt ihr Wachstum stehen (Küster 1911, S. 313).

Die terminalen Gallen schließen im allgemeinen das Wachstum der Fäden dauernd ab; offenbar bedeutet die Entwicklung eines oder mehrerer

Parasiten eine allzu große Stoffausgabe für die Hyphen, als daß im allge meinen weiteres Wachstum noch möglich wäre.

Zuweilen sieht man immerhin die Gallen „auswachsen" — und zwar in verschiedener Weise: Entweder es entsteht am Scheitel der Galle eine Hyphe von ungefähr normalen Proportionen, oder die pathologisch veränderte Hyphenspitze, die wir als Galle bezeichneten, setzt ihr Wachstum mit überraschender Breite fort, die der der Galle entspricht oder ihr nahekommt.

Vorgänge der ersten Art bedeuten eine Rückkehr zu normalen Gestaltungsverhältnissen und erinnern uns an die seit Beijerinck (1888) oftmals behandelte Erscheinung durchwachsener Gallen; der genannte Forscher betonte damals, daß auch aus Gallen, deren Formen von den normalen des Wirtes stark abweichen, beim Durchwachsen völlig normale Anteile sich entwickeln können, so daß ersichtlich wird, daß das Protoplasma auch bei der Gallenbildung seine spezifischen Eigenschaften und sein spezifisches Gestaltungsvermögen keineswegs verloren hat. So sehen wir auch hier im Kleinen dem pathologischen Wachstum eine Periode normaler Gestaltung folgen.

Vorgänge der zweiten Art lassen auf die Produktion des keulenartigen Gallenstücks neue, kurzzylindrische Stücke folgen, die in ihren Dimensionen und ihrem Protoplasmareichtum den Gallen ähnlich sind, oder wir sehen, daß die Galle sich verzweigt und ein seitliches Stück von den soeben beschriebenen Formenverhältnissen sich entwickelt. Wir müssen annehmen, daß in diesen Fällen die Wirkungen des Parasiten noch im Spiele sind oder vielleicht sogar von neuem eingesetzt haben. Gleichviel ob die neu entstandenen breiten Anteile terminal oder lateral sich entwickeln, in beiden Fällen fand ich sie frei von Schmarotzern.

Schmale und breite Hyphen entstehen, wenn Membranareale von kleinem oder großem Durchmesser die aus Reinhardts Untersuchungen bekannten Kugelkalotten bilden und sich mit Flächenwachstum betätigen. Jedem Mykologen ist bekannt, wie leicht man durch schlechte Ernährung der Pilzkulturen Hyphen von besonders schmalem Bau entstehen lassen kann; bei der Gallenbildung scheint der Fall gegeben zu sein, daß abnorm reicher Zustrom von Nährstoffen besonders große Wachstumsareale entstehen läßt. —

Auch die Entwicklung der Gallen versuchte ich durch Kultur auf festen Nährböden zu beeinflussen.

In Agarkulturen treten in der Tat Veränderungen in der Form der Gallen ein. Im normalen Substrat hört mit Beginn der Gallenbildung das Längenwachstum der Hyphen auf; in Agar sind Auswachsungen der Gallen die Regel, Seitenhyphen entwickeln sich ungehemmt weiter. Die auswachsenden Hyphen zeigen normales Wachstum.

Die Form der Gallen der zweiten entstehenden Generation in Agar ist oft sehr charakteristisch. In reinem Agar, ohne Peptonzusatz, erreichen die Gallen keine besondere Größe; die Hyphen sind schmal und plasmaarm. Die schmalen Hyphen gehen unmittelbar in die Kugel- oder Keulenform der Gallen über. Die Auswuchsstelle ist dagegen breit angelegt, die Hyphe kehrt langsam zur normalen Breite zurück. Wir finden hier entgegengesetzte Formen wie in Wasserkulturen. Seitenhyphen haben meist eine endständige Galle. Die auswachsenden Hyphen können wieder Gallen bilden. Oft erscheinen dann mehrere Gallen an einer Hyphe hintereinandergereiht.

An den ausgewachsenen Hyphen können Oogonien und Zoosporangien entstehen. In einem Falle war aus einer Galle unmittelbar ein Saprolegniazoosporangium ausgewachsen. In einem anderen Falle waren sogar 2 hintereinander geschaltete Oogonien unmittelbar aus einer Galle gewachsen. Nur durch die abschließenden Querwände der Oogonien konnten sie anfangs von der Galle mit dem Parasiten unterschieden werden: später bildeten sie Tüpfel aus, die der Gallenwand stets fehlen. Der Parasit bildete 3 lange Schläuche aus, der Inhalt zerfiel in Zoosporen, eine Entleerung fand jedoch nicht statt (vgl. Abb. 22). —

Während oder kurz nach der Infektion macht das Wirtsplasma keine sichtbare Veränderung durch. Das nackte Plasmaklumpchen des Parasiten scheint im Zellsaft zu liegen, das Wirtsplasma strömt an ihm vorbei. Nur manchmal, wenn gerade ein Parasit in die Richtung eines die Vakuole durchziehenden Plasmafadens zu liegen kommt, zucken die Körnchen des Wirtsplasmas, sobald sie in die Nähe des Parasiten kommen oder ihn berühren, zurück. Sie strömen ein kleines Stück rückwärts und nehmen ihren Weg wieder auf, einen Umweg um den Parasiten machend. Auch Plasmakörnchen, die seitlich vorbeifließen, erleiden durch den Parasiten oft eine geringe Abweichung ihrer Richtung. Hat der Parasit schon eine beträchtliche Größe erreicht, so nimmt das Wirtsplasma deutlich erkennbaren Anteil an seiner Entwicklung. Er ist dann anfangs von wenigen groben Körnchen des Wirtsplasmas umgeben. Diese bewegen sich in seiner Nähe außerordentlich lebhaft, so daß der Parasit selbst in eine allerdings nur bescheidene Bewegung gerät. Diese Vorgänge scheinen nur bei der allerersten Anlagerung von Wirtsplasma an den Parasiten stattzufinden, vielleicht sind sie pathologischer Natur; die Schläuche, an welchen ich die hier mitgeteilten Erscheinungen beobachtete, befanden sich in hängenden Tropfen, der in ihnen liegende Parasit stellte seine Entwicklung ein.

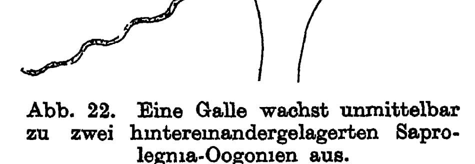


Abb. 22. Eine Galle wächst unmittelbar zu zwei hintereinandergelagerten Saprolegnia-Oogonien aus.

Mit der Größe, dem Plasmagehalt und dem Alter der Wirtshyphe wechseln die Einzelheiten des Entwicklungsganges der Parasiten und der Gallen. Selbst innerhalb einer Hyphe treten Unterschiede auf. Manche Parasiten sind nach wenigen Stunden schon von Wirtsplasmakörnchen umlagert, andere nach längerer Zeit noch völlig nackt. Die ersteren zeigen im allgemeinen eine stärkere Größenzunahme. In kräftigen, reich mit Plasma erfüllten Hyphen ist der Parasit im Jugendstadium länglich zylindrisch, oft wurst- oder S-förmig gebogen. Seine Länge schwankt zwischen 27 und 67 μ. Er ist völlig homogen, glasartig. Das Wirtsplasma ist normal, strömt lebhaft, den Parasiten mitbewegend.

Bei der Anlagerung des Wirtsplasmas werden oft bestimmte Punkte bevorzugt. So die Spitze des Parasiten oder die konkave Seite, wenn er gekrümmt ist. Haben sich einige Körnchen angelagert, so folgt die Häufung weiteren Plasmas ziemlich schnell. Plasmareiche Hyphen zeigen in diesem Entwicklungsstadium des Parasiten eine streifige, strähnige Struktur. Der

Parasit wächst schnell heran: um ihn herum beginnt sich das dichte Plasma zu lichten. Es treten kleine runde Vakuolen auf, die bald zu größeren zusammenfließen. Die Vakuolisierung macht Fortschritte. Das Plasma konzentriert sich mehr und mehr um den Parasiten: es ist grobkörnig bis schollenförmig, unterdessen hat sich eine Galle gebildet: fast sämtliches Wirtsplasma strömt bei ihr zusammen.

Während die Galle heranwächst. nehmen ihre Vakuolen an Umfang stark zu. Wir sehen schließlich an der Membran der Galle einen kräftigen Plasmabelag, einen ebensolchen und vielleicht noch stärkeren rings um den Parasiten und zwischen beiden ein System von Plasmalamellen, später von Plasmafäden. Die Konfiguration des Plasmas ist grundverschieden von der der normalen Hyphen. Wir bemerken, daß die Fäden des Protoplasmas, die den Vakuolenraum durchziehen und den plasmaumhüllten Parasiten mit dem wandständigen Plasma der Galle verbinden, nicht in strenger radialer Richtung streichen. sondern der Richtung der Längsachse des ganzen Hyphengallengebildes sich annähern und im unteren Teil der Galle nahezu in ihre Richtung sich einstellen. Die ringförmige Stelle, an welcher die Galle zur Breite der normalen Hyphe sich verengt, ist für die Ansetzung zahlreicher Protoplasmafäden der bevorzugte Ort.

Die Fäden, welche das Protoplasma bildet, sind recht widerstandsfähig. Sie erinnern uns an das „Fadenziehen“ des Entoplasmas, wie es F. Weber (1929) beschrieben hat; wir vergleichen diese Fäden und die Fadenbildungsfähigkeit des Protoplasmas mit den entsprechenden Erscheinungen, die am Ektoplasma derselben Zelle sichtbar gemacht werden können, wenn man die Gallen plasmolysiert und die Bildung Hechtscher Fäden beobachtet.

Bei beginnender Plasmolyse bilden sich derbe Protoplasmastränge zwischen den einzelnen größeren Protoplasmaanhäufungen. Das Protoplasma dieser Stränge kontrahiert sich in einigen Punkten; diese kleinen Protoplasmakonglomerate sind durch kurze dünne Fäden verbunden. Mit fortschreitender Plasmolyse zerreißen alsbald diese Verbindungsfäden. Sie erreichen nicht die Länge und Kontinuität der oben beschriebenen Fäden des Entoplasmas.

Die Konfiguration des Protoplasmas — gewaltige Anhäufung von Material in der Mitte der Zelle und Bildung einer peripheren Vakuole, nur von Plasmafäden durchzogen — stimmt im wesentlichen mit gewissen Erscheinungen überein, die uns aus der normalen Zytogenese bekannt sind: Ich erinnere z. B. an die von Strasburger (1880) beschriebenen Sporenmutterzellen von Anthoceros. Während bei diesem und ähnlichen Fällen zelleigene Massen die zentrale Plasmaanhäufung bilden, liegt in unserem Falle Häufung von zellfremdem Material vor.

Eine besondere, nicht geklärte Abweichung der Plasmakonfiguration bringen die Fälle, in welchen das Zoosporangium nicht nur von einer gleichmäßigen Protoplasmaschicht umhüllt wird, sondern auch diese noch eine große Zahl Protoplasmakugeln trägt, die trotz ihrer Selbständigkeit von demselben Wirtsplasma gebildet zu sein scheinen, wie Wandplasma und die Fäden. Die Zahl der Plasmakugeln, die auf einem Zoosporangium gefunden wurden, wechselt. Besonders anschaulich war diese Konfiguration in dem Fall, der in beistehender Abbildung dargestellt ist (vgl. Abb. 23).

Aus der Morphologie der Mesaphytenzelle (Cucurbita-Haare usw. — vgl. Heidenhains Abbildung bei Küster 1915) sind Fälle bekannt, in welchen das Protoplasma einer Zelle hier zu Strängen, dort zu grob alveo-

laren Ballen sich formt, vielleicht handelt es sich a in unserem Falle um ahnliche Unterschiede in der grob n Struktur barter Plasmateile

Naheren Einblick in die plasmatischen Eigenheiten Zellen suchten wir auf dem Wege der Plasmolyse zu gewinnen

Die Plasmolyse der Saprolegnia-Hyphen verlauft in de schiedenen Myzelfaden verschieden Dunne, plasmaarme Hyphen schon bei geringer Konzentration (0,1 n KNO_3) stark plasmolysiert wahrend bei kraftigen, mit grobkornigem Plasma reichgefullten Hyphen die Plasmolyse erst bei wesentlich hoherer Konzentration (0,4 n KNO_3) eintritt

Wir benutzten 2 Plasmolytika, KNO_3 und Rohrzucker

Versuche mit KNO — Unabhangig von dem durch den Ernahrungszustand der Hyphen bedingten osmotischen Unterschied macht sich bei der Behandlung mit KNO_3 ein zeitlicher Unterschied (1—5 Min) im Eintreten der Plasmolyse zwischen infizierten Hyphen und nicht infizierten bemerkbar Untersucht man Hyphen, die bereits zur Gallenbildung sich anschicken, so sieht man in der unmittelbaren Umgebung des Parasiten die Plasmolyse spater eintreten als an den ubrigen Anteilen der Hyphen Auch das Alter des Parasiten beeinflußt das Plasmolysebild Hat der Parasit schon eine deutliche Membran, so tritt in der Galle selbst erst bei starkerer Konzentration oder zu spaterem Zeitpunkt die Plasmolyse ein In jungen Stadien, wenn noch keine Galle gebildet ist, tritt kein Unterschied im Plasmolysebeginn innerhalb der infizierten Hyphen auf



Abb 23 Abweichende Protoplasma Konfiguration an einem Zoosporangium

Selten ist der Fall und nur bei jungen Parasiten zu finden, daß durch die Zusammenziehung des Wirtsplasmas der Parasit streckenweise bloßgelegt wird In der Regel hauft sich das Wirtsplasma um den Parasiten und lost sich dabei oft allseits von der Gallenwand ab. Auch die Zoosporangien lassen sich plasmolysieren, wir kommen auf sie bei Behandlung unserer Rohrzuckerversuche zuruck

Plasmolysiert man Hyphen mit sehr jungen Parasiten und laßt wieder vorsichtig Deplasmolyse eintreten, so erfahren die Parasiten in ihrer Entwicklung keine Veranderung

Versuche mit Rohrzucker — Bringt man infizierte Hyphen mit starker Gallenbildung in 10 proz Rohrzuckerlosung, so tritt in den Hyphen starke Plasmolyse ein, die Gallen selbst werden meist nicht plasmolysiert oder wenn doch, so rundet sich das Plasma um den Parasiten herum ab Die Plasmaverbindung mit dem ubrigen Teil der Hyphe zerreißt oder bleibt nur auf einen dunnen Faden beschrankt Das abgetrennte Plasma

in der Galle bildet gegen den übrigen Hyphenteil eine Querwand aus; der Parasit nimmt das Protoplasma innerhalb der jetzt durch eine Membran völlig abgeschlossenen Galle auf und vollendet normal seinen Entwicklungsgang, nimmt allerdings an Größe nicht mehr zu. Er ist also noch entwicklungsfähig, wenn ihm auch nur ein sehr kleiner Teil seines Wirtes zur Verfügung steht.

Der durch die neugebildete Membran abgeschlossene Hyphenteil behält sein Plasma und verhält sich wie normale, nicht infizierte Hyphen.

In 20 proz. Rohrzuckerlosung tritt Plasmolyse des Parasiten sehr langsam ein. Sporangien, die schon der Reife nahe sind. kommen auch in der Rohrzuckerlösung noch normal zur Entleerung. In jüngeren Sporangien von runder Form hebt sich das Protoplasma völlig von der Membran ab und bildet eine neue Membran. Bei längerer Einwirkung des Plasmolytikums (24 Std.) kann sogar noch eine 3. Membran gebildet werden. Bei ovaler Form des Zoosporangiums hebt sich das Plasma von den Polen der Zelle ab. — In 10 proz. Rohrzuckerlösung tritt erst im Zeitraum von 24 Std. nur bei einem Teil der Sporangien schwache Plasmolyse ein. Die anderen gelangten normal zur Reife oder zeigten keinerlei Einwirkung.

Die Gallen sind turgeszente Gebilde, ihre Membran ist gespannt. Durch Plasmolyse oder durch Behandlung mit schwach hypertonischen Lösungen, welche noch keine Ablösung des Protoplasten von der Membran bewirken, läßt sich die Membran in bekannter Weise entspannen. Auffallend ist, daß die Membran der Galle hierbei eine recht beträchtliche Verkürzung erfährt. Uns ist dieser Befund überraschend, weil Reinhardt (1880) bei der Plasmolyse wachsender Saprolegnia-Fäden keine meßbare Verkürzung der Membran an der wachsenden Spitze der Zelle feststellen konnte. Es scheint, daß die Zunahme des Zellendurchmessers eine bei normalen schmalen Hyphen nur sehr geringe Verkürzung zur Folge hat, bei den weitlumigen Gallen zu beträchtlichen Werten sich steigert. in ähnlicher Weise wie es G. Ritter (1915) für Kugelhefen und ähnliche abnorm verbreiterte Zellformen von Hymenomyzeten angibt.

Nachfolgend gebe ich Ergebnisse einiger meiner Messungen:

	vor		nach		vor		nach		vor		nach	
Breiten .	223	103,5	216	99	39	34,5	34,5	30	133	120	122	115
Längen .	2016		1732		230		218,5		787,5		756	

Sie beziehen sich auf Gallen mit starkem Protoplasmagehalt. Gallen, deren Protoplasma im Schwinden begriffen war, blieben bei Plasmolyse ohne meßbare Entspannung. Dieser Befund war zu erwarten. Vermutlich war die Entspannung der Membran und ihre Verkürzung nach Verlust der Turgorspannung bereits vor der Behandlung mit hypertonischer Lösung erfolgt.

Ein weiteres Hilfsmittel, dessen ich mich bei der Untersuchung des Gallenprotoplasmas bediente, war die Vitalfärbung. Mit Guilliermond (1929) bediente ich mich des Neutralrotes, das nicht nur die Vakuolen von Saprolegnia, sondern auch die ihres Parasiten kräftig färbt. Das Farbstoffspeicherungsvermögen des Parasiten ist stärker als das des Wirtes. Wenn die Vakuolen der Gallen gefärbt sind. so kann durch den Parasiten im Laufe mehrerer Stunden der Farbstoff ihnen wieder entzogen werden. Die Gift-

wirkung des Neutralrotes ist unverkennbar: Stark gefärbte Zoosporangien kontrahieren ihren Inhalt und bilden dabei neue Membranhüllen aus, wie nach der in hypertonischen Mitteln entstandenen Plasmolyse.

Zusammenfassung.

1. Die Zoosporen von Olpidiopsis saprolegniae machen eine zweimalige Schwärmzeit durch. Nach der ersten setzen sie sich auf Saprolegnia-Hyphen fest. Sie bleiben nackt und führen amöboide Bewegungen aus. Nach der zweiten Schwärmperiode wird sofort eine Membran gebildet, die Infektion erfolgt bald, die Membranhülle bleibt außen haften.

2. Größe und Entwicklungsdauer des Parasiten sind abhängig von der Konstitution der infizierten Hyphen, der Temperatur und der Ernährung.

3. Amöboide Bewegungen des Parasiten konnten nur in den ersten Jugendstadien beobachtet werden. In älteren Stadien hat er glatte Umrisse. Das ihn umhüllende Wirtsplasma ist mannigfaltigen Formveränderungen unterworfen.

4. Dauerzysten entstehen bei niederer Temperatur. Sie haben eine, bisweilen 2 bis 3 Anhangszellen. Dauerzysten und Zoosporangien können in einer Galle nebeneinander vorkommen.

5. Auf künstlichen festen Substraten wachsen die Entleerungsschläuche zu langen Hyphen aus, die zum Teil nicht mehr als Entleerungsschläuche zu funktionieren vermögen.

6. Infizierte Hyphen unterscheiden sich, bevor es an ihnen zur Gallenbildung kommt, von den normalen durch gehemmtes Längenwachstum, geförderte Breitenentwicklung und besonders körniges, stoffreiches Protoplasma.

7. Der Parasit erzeugt Gallen, indem er die Wirtshyphe zu abnormem Breitenwachstum anregt.

8. In 1- und 5 proz. Rohrzuckerlösung tritt eine Wachstumshemmung des Parasiten ein, in 10 proz. Wachstumsstillstand.

9. Die Gallen stehen terminal oder interkalar. Es wird wahrscheinlich gemacht, daß auch an ausgewachsenen Teilen von Hyphen spindel- oder tonnenartige Erweiterungen vom Parasiten veranlaßt werden können.

10. Die Form der Gallen wechselt. Bestimmend auf sie wirken Größe und Protoplasmareichtum der Wirtshyphen und die Zahl der Parasiten, die eine Wirtshyphe infizierten.

11. Der Parasit vermag in der Wirtshyphe beträchtlich weite Strecken zurückzulegen.

12. In Agarkulturen treten Anomalien der Gallenformen auf.

13. Die Konfiguration des Protoplasmas kranker Hyphen zeigt eine erhebliche Abweichung von der normaler Hyphen und wird gekennzeichnet durch sehr starke Fadenbildung seitens des Endoplasmas und zentrale, den Parasiten umhüllende Plasmahäufung.

14. Bei Plasmolyse der Gallen tritt eine erhebliche Verkürzung ihrer Membran auf.

14. In hypertonischen Lösungen kann man den Parasiten veranlassen, nach Plasmolysen sich wiederholt neu zu umhäuten.

16. Die Hyphen werden nur an denjenigen Stellen zur Gallenbildung angeregt, an welchen der Parasit liegt.

17. Verlassene Gallen bleiben im Wachstum stehen.

18. Durchwachsene Gallen kehren zu den normalen Formenkennzeichen des Wirtes zurück.

19. Parasit und Wirt lassen sich mit Neutralrot vital färben. Der Parasit färbt sich besonders stark und erweist sich gegen die Giftwirkung allzu starker Neutralrotlösung widerstandsfähiger als die Wirtshyphen.

20. Die Entwicklung des Parasiten ist mit seinen letzten Reifestadien nicht an den Wirt gebunden; isolierte Parasiten gelangen in Agar zur Reife, bilden Entleerungsschläuche und entleeren Zoosporen.

Literatur.

1. Barrett, W., Development and sexuality in some species of Olpidiopsis. (Ann. of Bot. Vol. 26. 1912. p. 209.) — 2. Beijerinck, M. W., Über Cecidium von Nematus Capreae auf Salix amygdalina. (Bot. Ztg. Bd. 46. 1888. S. 1.) — 3. Braun, Al., Über Chytridium, eine Gattung einzelliger Schmarotzergewächse auf Algen und Infusorien. (Abhandl. d. kgl. Akad. Berlin 1855. 1856. S. 61.) — 4. Braun, Al., Über einige neuere Arten der Gattung Chytridium und die denen verwandten Gattung Rhizidium. Berlin 1856. — 5. Braun, Al., Betrachtungen über die Erscheinungen der Verjungung in der Natur. Freiburg i. B. 1849. S. 286. — 6. Cienkowski, Algologische Studien. (Bot. Ztg. Bd. 3. 1855. S. 801.) 7. Claussen, P., Über Entwicklung und Befruchtung von Saprolegnia monoica. (Ber. d. D. Bot. Ges. Bd. 26. 1908. S. 144.) — 8. Constantineanu, I. C., Contributions à la flore mycologique de la Romanie. (Rev. gén. d. Bot. T. 13. 1901. p. 369.) — 9. Cornu, M., Monographie des Saprolegniées. (Ann. des Sc. Nat. Bot. Sér. V. T. 15. 1872. p. 145.) — 10. De Wildemar, E., Notes Mycologiques. (Ann. Soc. belge Microsc. T. 17. 1893. p. 35.) — 11. Dangeard, P. A., Recherches histologiques sur les champignons. (Le Botaniste. Sér. 2. 1890. p. 88.) — 12. Fischer, A., Über die Stachelkugeln in Saprolegniaschläuchen. (Bot. Ztg. Bd. 38. 1880. S. 689, 705, 725.) — 13. Fischer, A., Untersuchungen über die Parasiten der Saprolegnien. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 13. 1882. S. 286.) — 14. Fischer, A., Untersuchungen über die Parasiten der Saprolegnien. Berlin 1882. Habilitationsschrift. — 15. Fischer, A., Phycomyceten in: Rabenhorst, Kryptogamenflora. 2. Aufl. Bd. 1. Abt. 4. Leipzig 1891. S. 37. — 16. Gäumann, E., Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena 1926. — 17. Guilliermond, A., Sur le développement d'un Saprolegnia etc. (C. R. Acad. Sc. T. 189. 1929. p. 1201.) — 18. Klebs, G., Zur Physiologie der Fortpflanzung einiger Pilze. II. Saprolegnia mixta. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 33. 1899. S. 513.) — 19. Küster, E., Die Gallen der Pflanzen. Leipzig 1911. — 20. Küster, E., Zelle und Zellteilung. (Handwörterb. d. Naturwissensch. Bd. 10. 1915. S. 753.) — 21. Küster, E., Pathologische Pflanzenanatomie. 3. Aufl. Jena 1925. S. 297. — 22. Migula, W., Phycomyceten in: Thomé-Migula, Kryptogamenflora. 3. Teil. I. 1910. S. 102. — 23. Minden, M. von, Chytridiinae. (Kryptogamenflora der Mark Brandenburg. Bd. 5. 1911. S. 208.) 24. Molisch, H., Mikrochemie der Pflanze. Jena 1913. — 25. Müller, F., Untersuchungen über die chemotaktische Reizbarkeit der Zoosporen von Chytridiaceen und Saprolegniaceen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 49. 1911. S. 421, 446.) — 26. Naegeli, C. v., Zellkerne, Zellbildung und Zellenwachstum bei den Pflanzen. (Zeitschr. f. wiss. Bot. Bd. 3. 1846. S. 29.) — 27. Pfeffer, W., Lokomotorische Richtungsbewegungen durch chemische Reize. (Unters. a. d. bot. Inst. Tübingen. Bd. 1. 1884. Heft 3.) — 28. Pringsheim, N., Befruchtung und Generationswechsel der Algen. (Monatsber. d. kgl. Akad. d. Wiss. Berlin 1857.) — 29. Pringsheim, N., Beiträge zur Morphologie und Systematik der Algen. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 1. 1858. S. 284.) — 30. Pringsheim, N., Beiträge zur Morphologie und Systematik der Algen. (Ibid. Bd. 2. 1860. S. 221.) — 31. Reinhardt, M. O., Plasmolytische Studien zur Kenntnis des Wachstums der Zellmembran. (Festschr. f. Schwendener. Berlin 1899. S. 425.) — 32. Reinsch, F. P., Beobachtungen über einige neue Saprolegnieae usw. (Jahrb. f. wiss. Bot. Bd. 11. 1878. S. 304.) — 33. Ritter, Georg, Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die Mucoraceen usw. (Ibid. Bd. 52. 1913. S. 385.) — 34. Schwarze, Ch., The method of cleavage in the sporangia of certain fungi. (Mycologia. Vol. 14. 1922. p. 143.) — 34a. Varitchak, B., Remarques sur la répartition du cytome au moment de la formation des

zoospores. (C. R. Acad. Sc. Paris. T. 192. 1931. p. 371.) — 35. Weber, F., Fadenziehen des Entoplasmas bei Spirogyra. (Protoplasma. Bd. 6. 1929. S. 159.) — 36. Wisselingh, C. van, Die Zellmembran. (Handb. d. Pflanzenanatomie. Bd. 3. Berlin 1924.) — 37. Zopf, W., Zur Kenntnis der Phycomyceten. (Nova Acta Leop. Bd. 47. 1885. S. 145.) — 38. Zopf, W., Über einige niedere Algenpilze und neue Methoden, ihre Keime aus dem Wasser zu isolieren. (Abh. d. naturf. Ges. Halle. Bd. 17. 1892.)

Nachdruck verboten.

Untersuchungen über den Einfluß von Lithiumchlorid auf Bact. coli.

II. Mitteilung.

Physiologische Beobachtungen.

Von **Karl Richter**, Kiel.

Mit 6 Abbildungen im Text.

In einer früher[1]) veröffentlichten Arbeit gelang es mir, den Nachweis zu führen, daß die in LiCl-haltigen Nährböden auftretenden Formen nur als teratologische Formen von Bact. coli zu deuten sind und nicht besondere Lebewesen darstellen. Diese Ansicht war von Kuhn und Sternberg geäußert worden, die in den abweichenden Formen besondere, als Parasiten der Bakterien gedeutete Lebewesen festgestellt zu haben glaubten. Im Zusammenhang mit den morphologischen Untersuchungen erschien es wichtig, Versuche durchzuführen, die über die Frage Aufschluß geben sollten, ob parallel mit den morphologischen Veränderungen Verschiebungen des Stoffwechsels und der Zusammensetzung der Bakterien eintreten, die geeignet sind, eine Erklärungsmöglichkeit für die morphologischen Veränderungen zu bieten. Diese Untersuchungen erstreckten sich auf Bestimmungen des Trockensubstanzgehaltes sowie auf Untersuchungen der Atmung und der Gärung. Zu den Untersuchungen wurden die gleichen Stämme verwendet wie zu den morphologischen Untersuchungen.

Die Versuche zerfallen in 2 Gruppen, in der ersten Versuchsgruppe wurden die Organismen auf LiCl-haltigen Nährböden vorgezüchtet und ihre Stoffwechselenergie nach Rückimpfung auf LiCl-freie Nährböden bestimmt; in der 2. Versuchsgruppe kamen Organismen zur Verwendung, die auf LiCl-freien Nährböden gezüchtet waren; ihre Stoffwechselenergie wurde nach Überimpfung auf LiCl-haltige Nährböden untersucht.

A. Vorzüchtung auf LiCl-haltigen Nährböden.

1. Untersuchungen über den Gehalt an Trockensubstanz.

Das Bakterienmaterial zu den Trockensubstanzbestimmungen wurde auf festen Nährböden vorgezüchtet, da bei einer Vorzüchtung in flüssigen Nährböden eine Abtrennung der Bakterienmasse von dem Nährboden nur unter Verwendung der Zentrifuge möglich gewesen wäre. Diese Art der Gewinnung hätte sich sehr zeitraubend gestaltet, so daß die Gefahr bestand, daß Veränderungen des Materials während dieser Periode eintreten könnten.

---

[1]) Richter, Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 134—148.

Als Nährboden für die Vorzüchtung wurde ein kochsalzfreier Fleischwasseragar mit 1% Pepton und 2,5% Agar verwendet, der auf einen ph = 7,2 eingestellt war. Zur Herstellung der Platten einer Versuchsserie wurde, um Schwankungen des Wassergehalts zu vermeiden das gesamte benötigte Material einem Vorratskolben entnommen. Zur Anlage einer Petrischale wurden 18 ccm Agar mit 2 ccm steriler 10 proz. Lithiumchloridlösung bzw. bei den Kontrollen mit 2 ccm Wasser vermischt und dann in Petrischalen von 10 cm Durchmesser ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden die Platten mit Hilfe eines Drigalskyspatels mit Material aus einer Stammkultur beimpft. Die Bebrütung der Platten erfolgte bei Zimmertemperatur in feuchten Kammern. Um auch hier gleiche Verhältnisse sicherzustellen, wurde jede feuchte Kammer mit der gleichen Anzahl Kontroll- und Versuchsschalen beschickt. Bei Züchtung bei höherer Temperatur wurde ein Thermostat benutzt, in dem durch Einstellen einer großen, flachen Schale mit Wasser eine Sättigung der Luft mit Wasserdampf erzielt wurde.

Die Entnahme des Bakterienrasens von den Schalen erfolgte mit Hilfe steriler Deckgläser, die ein Zusammenschieben des Rasens gestatteten, ohne daß Nährbodenbestandteile erfaßt wurden. Das Material wurde dann sofort auf sterile gewogene Deckgläser übertragen und gewogen. Nach Feststellung des Feuchtgewichts wurden die Deckgläser bei 105° C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Trocknung war im allgemeinen in 3 Std. beendet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tab. 1 niedergelegt.

Tab. 1. Beeinflussung des Trockensubstanzgehaltes durch LiCl-Nahrboden.

Datum	Kontrolle			1% LiCl, 24 Std.			1% LiCl, 48 Std.		
	Gewicht feucht	Gewicht trocken	% Tr.	Gewicht feucht	Gewicht trocken	% Tr.	Gewicht feucht	Gewicht trocken	% Tr.
9. 11.	16,0	3,7	22	12,1	2,4	20	—	—	—
10. 11.	32,0	7,6	22	—	—	—	59	9,0	15
27. 11.	44,2	9,9	22	34,9	7,1	20	—	—	—
30. 11.	58,2	13,3	23	—	—	—	16,4	3,0	18
1. 12.	81,6	18,0	22	53,7	9,7	18	—	—	—
5. 12.	42,9	9,6	22	34,3	6,0	17,5	—	—	—
6. 12.	42,9	9,6	22	42,7	7,6	17,5	—	—	—
7. 12.	44,7	9,9	22	42,6	8,0	19	—	—	—
Mittelwerte:			22,2			18,7			16,5

Der Trockensubstanzgehalt der Kontrollen zeigte nur Schwankungen zwischen 22 und 23%, diese Konstanz des Wassergehaltes ist ein Beweis dafür, daß die angewendete Methode eine befriedigende Genauigkeit aufweist. Wie aus Tab. 1 hervorgeht, lag bei den auf LiCl-haltigen Nährböden gezüchteten Bakterien der Gehalt an Trockensubstanz erheblich niedriger, einem Mittelwert von 22,2% für die Kontrollen steht bei 1,0% LiCl-Zusatz ein Mittelwert von nur 18,7% gegenüber. Bei den wenigen Versuchen mit 2% LiCl-Zusatz zeigt sich deutlich die Tendenz zu einer weiteren Zunahme des Wassergehalts. Auf die Bedeutung dieser Tatsache wird weiter unten noch näher eingegangen.

2. Beeinflussung der Atmungsintensität.

Die Bestimmung der Atmungsintensität erfolgte nach der manometrischen Methode von Warburg. Die Gewinnung des Bakterienmaterials

war die gleiche wie bei der Bestimmung der Trockensubstanz. Von dem Bakterienmaterial wurde unmittelbar vor Versuchsbeginn eine abgewogene Menge in Fleischwasserbouillon (ph = 7,2) durch kräftiges Schutteln verteilt und eine genau abgemessene Menge dieser dichten Aufschwemmung in die Atmungströge eingefullt. Der Ansatz wurde mit KOH beschickt. Die Untersuchung erfolgte im W a r b u r g - Thermostaten bei 30 ± 0,5° C. Die Berechnung des O_2-Verbrauchs erfolgte auf mg Bakterientrockenmasse.

Von den Ergebnissen dieser Versuchsgruppe seien hier nur die Kurven der Versuche vom 9. und 10. Nov. wiedergegeben (Abb. 1). Gegenuber den Kontrollen zeigen die auf LiCl vorgezüchteten Organismen in der ersten bzw. in den ersten 2 Std. nach Überimpfung in Fleischwasserbouillon einen geringeren O_2-Verbrauch pro mg Bakterientrockensubstanz; nach Ablauf dieser Frist steigt der Verbrauch in der Zeiteinheit auf denselben Wert wie bei der Kontrolle. Für die Kontrolle ergibt sich für den O_2-Verbrauch eine lineare Abhängigkeit, während die Kurven fur die unter LiCl-Einfluß gewachsenen Organismen in einen linearen Endteil und einen der Verzögerungsphase entsprechenden Anfangsteil zerfallen. Die mathematische Auswertung der linearen Endstücke der Kurven führt zu folgenden Gleichungen:

a) Kontrolle $y = 19{,}1\,x$
b) LiCl. 24 h $y = 19{,}3\,x - 11{,}6$
c) LiCl, 48 h $y = 19{,}5\,x - 21{,}3$

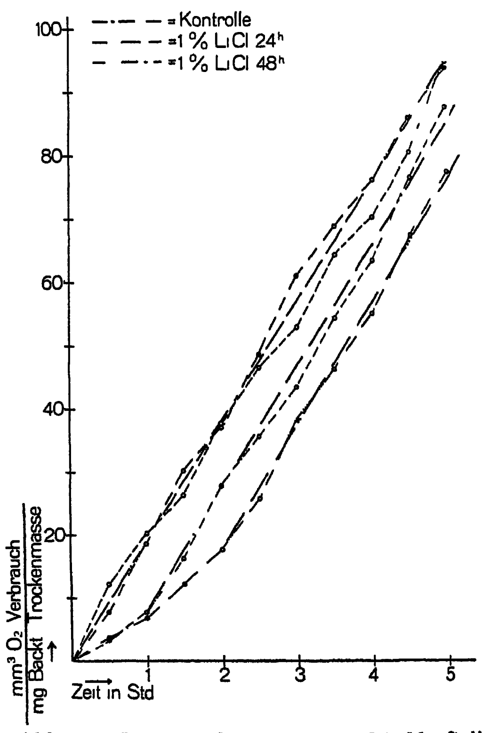


Abb. 1. V e r s u c h v o m 9. u. 10. 11. Coli C_5 24 bzw. 48 Std. 30° Bouillonagar ph 7,2 bzw. 1% LiCl-Agar ph 7,2 vorgezuchtet. Atmungsversuch in Bouillon ph 7,2.

Die Atmung nimmt also nach Ablauf einer kurzen Übergangszeit vollständig mit der Kontrolle übereinstimmende Werte an. Diese Übergangszeit entspricht, wie die morphologischen Untersuchungen gezeigt haben, dem Zeitraum, der zur Rückbildung eines großen Teiles der teratologischen Formen notwendig ist.

3. Beeinflussung der Gärungsintensität.

Die Bestimmung der Gärungsintensität erfolgte durch Messung der in CO_2- bzw. H_2-Atmosphäre gebildeten Gasmengen. Als Nährflussigkeit wurde Traubenzuckerbouillon mit 0,5% Dextrose verwendet. Die Berechnung der gebildeten Gasmengen erfolgte ebenso wie bei den Atmungsversuchen auf mg Bakterientrockenmasse. Von den Versuchsergebnissen seien hier nur die Ergebnisse der Versuchstage vom 7. Dez. und 30. Nov. wiedergegeben (Abb. 2 und 3).

Entsprechend den Ergebnissen der Atmungsversuche zeigen auch bei diesen Versuchen die auf LiCl-Nährböden vorgezüchteten Bakterien zu Beginn der Versuche eine Hemmung der Gärungsintensität, die um so stärker ist, je stärker die Einwirkung des LiCl gestaltet wurde. Nach Ablauf dieser Hemmungsperiode wurden auch für die bei der Gärung gebildeten Gasmengen die gleichen Werte gefunden wie bei den Kontrollen.

Tab. 2. ph-Werte (7. 11.).

Zeit	Kontrolle	Versuchsgefäß	Zeit	Kontrolle	Versuchsgefäß
11 Uhr	6,04	6,06	15 Uhr	5,71	5,76
13 Uhr	5,89	5,89	17 Uhr	5,60	5,60

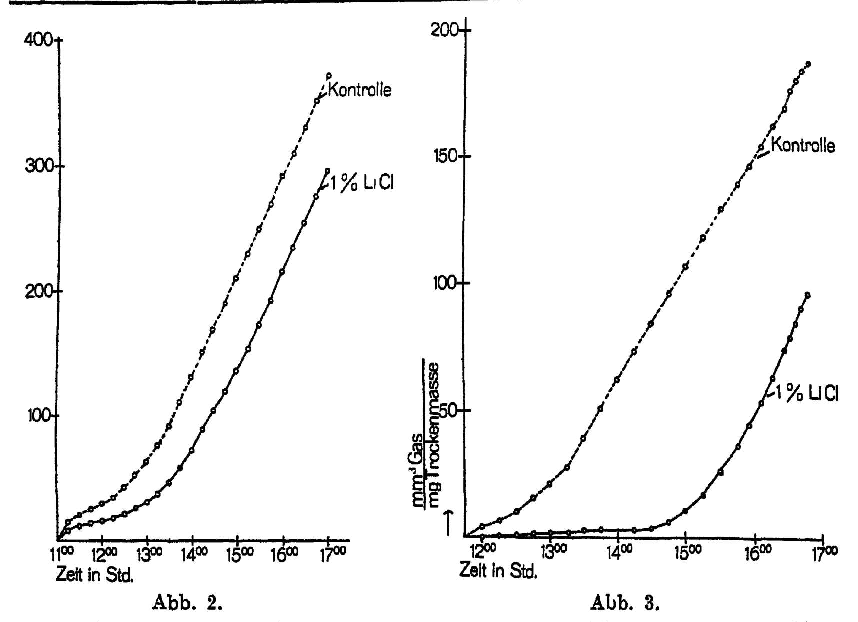


Abb. 2. Abb. 3.

Abb. 2. Versuch vom 7. 12. Coli C_5 24 Std. Z. T. auf Bouillonagar bzw. 1% LiCl-Agar vorgezüchtet. Gärungsversuch in Traubenzuckerbouillon, CO_2-Atmosphäre.

Abb. 3. Versuch vom 30. 11. Coli C_5 48 Std. Z. T. auf Bouillonagar bzw. 1% LiCl-Agar vorgezüchtet. Gärungsversuch in Traubenzuckerbouillon, H-Atmosphäre.

Tab. 3. Keimzahlen (in Millionen) (7. 11.).

Zeit	Kontrolle	Versuchsgefäß	Zeit	Kontrolle	Versuchsgefäß
11 Uhr	307	91	15 Uhr	358	150
13 Uhr	370	106	17 Uhr	385	219

Für den Versuch vom 7. Dez. seien hier gleichzeitig die Veränderungen der Reaktion und der Keimzahl während der Versuchsdauer angegeben (Tab. 2 und 3). Die Einstellung des Anfangs-ph-Wertes auf Werte von 6,04 bzw. 6,06 ist auf die vor Versuchsbeginn erfolgte Absättigung des Nährbodens mit CO_2 zurückzuführen, diese Absättigung war notwendig, um eine

einwandfreie Messung der gebildeten Gasmengen zu gewährleisten. Wie aus der Tab. 2 hervorgeht, erfolgte die Verschiebung der Reaktion in beiden Gefäßen vollkommen gleichmäßig. Bei den Keimzahlen trat dagegen ein bemerkenswerter Unterschied zwischen Kontrolle und Versuchsgefäß auf. Die Kontrolle zeigte bei einer 6 stund. Versuchsdauer nur eine Zunahme der Keimzahl um etwa 25%, während bei dem Versuchsgefäß eine Zunahme um mehr als 100% festzustellen ist. Die Anfangskeimzahl betrug dagegen bei dem Versuchsgefäß nur etwa 30% der Kontrolle, trotzdem gleiche Mengen Bakterienfeuchtmasse pro ccm Flüssigkeit angewendet wurden. Aus diesen Zahlen folgt, daß die Einzelorganismen bei LiCl-Vorzüchtung ein wesentlich großeres Volumen besaßen, als die Einzelorganismen in der Kontrolle. Die Zunahme der Zahl der Organismen bei dem Versuchsgefäß ist nach den Ergebnissen der morphologischen Untersuchungen in erster Linie auf einen Übergang dieser „Blähformen" in normale Formen zurückzuführen.

B. Vorzüchtung auf normalen Nährböden.

1. Beeinflussung der Atmungsintensität.

Die Untersuchungen erfolgten in gleicher Weise wie die entsprechenden Untersuchungen des vorigen Abschnittes. Als Nährboden fur die Vorzüchtung wurde Fleischwasser-Pepton-Agar (ph = 7,2) verwendet. Die Versuche wurden in Fleischwasser-Bouillon gleicher Reaktion unter Zusatz von steriler LiCl-Lösung bzw. unter Zusatz von Wasser durchgeführt. Die Berechnung der Versuche erfolgte auch hier auf mg Bakterientrockenmasse.

Von den Versuchen dieser Gruppe seien hier nur die Ergebnisse des Versuchs vom 9. Januar wiedergegeben, da sämtliche anderen Versuche dieser Versuchsgruppe den gleichen charakteristischen Verlauf zeigten. Die O_2-Verbrauchsmengen pro mg Bakterientrockensubstanz sind in der Abb. 4, die Veränderungen der Reaktion und der Keimzahl in der Tab. 4 wiedergegeben.

Durch den Zusatz von LiCl wird, wie aus den Versuchen hervorgeht, eine Hemmung der Atmung herbeigeführt, die eigenartigerweise bei 0,83% LiCl-Zusatz stärker ist als bei 1,67%. Der Unterschied trat besonders während der ersten Versuchsstunden deutlich hervor, später

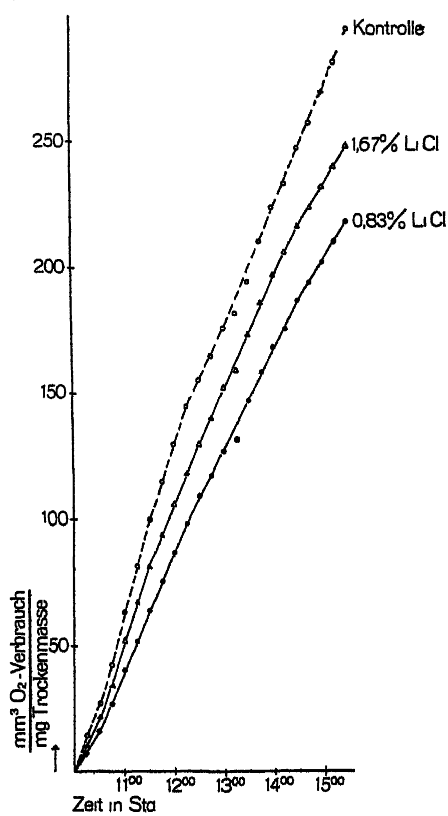


Abb. 4. Versuch vom 9. 1. Coli C,. Vorzuchtung 24 Std. Bouillonagar ph 7,2. Atmungsversuch in Bouillon bzw. LiCl-Bouillon.

war bei beiden Zusatzmengen die gleiche Senkung des O_2-Verbrauchs gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Bei den Keimzahlen (Tab. 4) zeigte die Kontrolle eine Steigerung um ca. 65%, der Versuch mit 0,83% LiCl-Zusatz eine Steigerung um ca. 25%, während bei 1,67% LiCl-Zusatz eine Abnahme um ca. 30% eintrat. Der mittlere O_2-Verbrauch betrug bei der Kontrolle pro mg Bakterientrockenmasse und Std. 53,5 cmm, bei 0,83% LiCl-Zusatz 39,8 cmm und bei 1,67 cmm 45,0 cmm.

Tab. 4. Keimzahlen (in Millionen) und ph-Werte (9. 1.).

	Kontrolle		0,83% LiCl		1,67% LiCl	
	Keime	ph	Keime	ph	Keime	ph
Beginn	323	7,18	319	7,18	302	7,18
Ende	494	6,98	399	6,88	268	6,77

2. Beeinflussung der Gärungsintensität.

Die Versuchsmethodik war die gleiche wie bei den entsprechenden Versuchen des Abschnittes A. Es kam als Nährlösung eine 0,5 proz. Dextroselösung zur Anwendung, die Versuche wurden in CO_2-Atmosphäre durchgeführt. Vor Beginn der Versuche wurde die Nährlösung mit CO_2 bei einer Temperatur von 30° C abgesättigt.

Als typische Beispiele aus dieser Versuchsgruppe seien hier die Kurven der Versuche vom 13. und 14. Dez. angeführt (Abb. 5 und 6). Die zugehörigen Werte für die Veränderung der Reaktion und der Keimzahlen sind in den Tab. 5 und 6 niedergelegt.

Tab. 5. Keimzahlen (in Millionen) und ph-Werte (14. 12.).

Zeit	Kontrolle		1% LiCl		Zeit	Kontrolle		1% LiCl	
	Keime	ph	Keime	ph		Keime	ph	Keime	ph
10 Uhr	86	5,60	83	5,58	14 Uhr	101	5,68	46	5,68
12 Uhr	96	5,77	51	5,77	16 Uhr	177	5,60	55	5,64

Tab. 6. Keimzahlen (in Millionen) und ph-Werte (13. 12.).

Zeit	Kontrolle		0,5% LiCl		Zeit	Kontrolle		0,5% LiCl	
	Keime	ph	Keime	ph		Keime	ph	Keime	ph
10 Uhr	83	5,60	83	5,63	14 Uhr	103	5,68	95	5,75
12 Uhr	83	5,80	71	5,79	16 Uhr	130	5,48	121	5,61

In beiden Versuchen wird durch den Zusatz von LiCl eine wesentliche Herabsetzung der Gärungsintensität bewirkt, hier zeigt sich bei dem Zusatz von 1,0% eine stärkere Hemmung als bei Zusatz von 0,5%. Bei der Reaktionsverschiebung zeigt sich bei 0,5% LiCl-Zusatz gegenüber der Kontrolle nur eine verhältnismäßig geringe Hemmung, während bei den Keimzahlen praktisch kein Unterschied festzustellen ist. Bei einem Zusatz von 1,0% LiCl trat während der Versuchszeit ebenso wie bei der Kontrolle keine wesentliche Veränderung der Reaktion ein, bei der Keimzahl stand dagegen

einer Keimvermehrung von 100% bei der Kontrolle ein Rückgang um 40% bei dem Versuchsgefäß gegenuber. Die im Mittel während 1 Std. erzeugten Gasmengen pro ccm Bakterientrockensubstanz betrugen bei den Kontrollen 150 bzw. 158 cmm, bei dem Versuch mit 0,5% LiCl 120 cmm und bei 1,0% LiCl-Zusatz nur noch 104 cmm Gas.

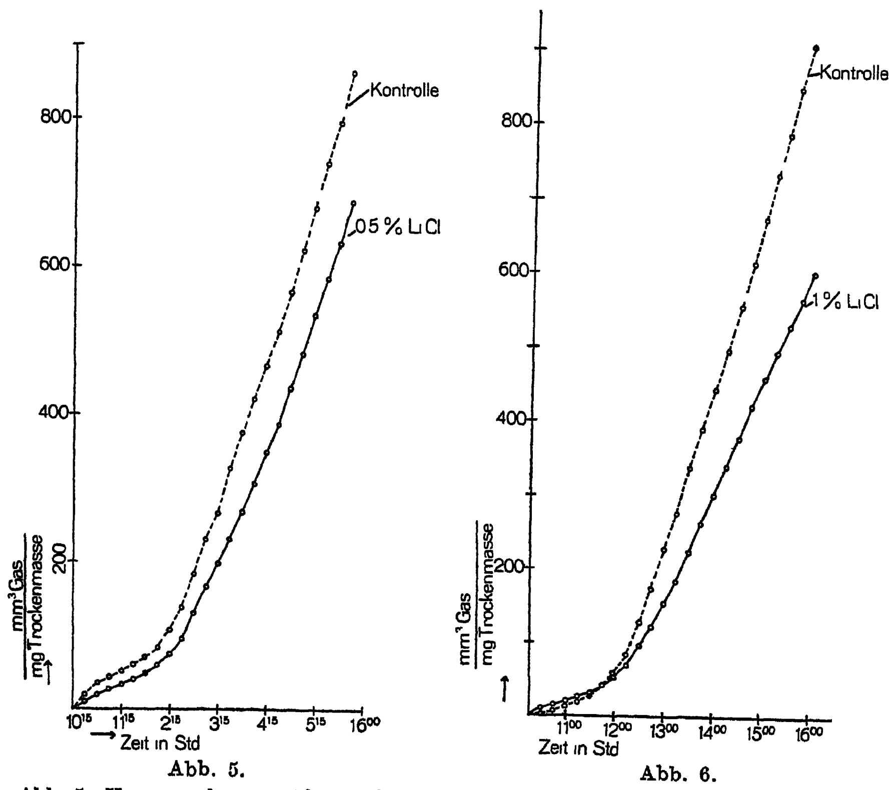


Abb. 5. Abb. 6.

Abb. 5. Versuch vom 13. 12. Coli C_5 24 Std Z T Bouillonagar ph 7,2. Garung in 0,5% Traubenzuckerlosung, CO_2-Atm.

Abb. 6. Versuch vom 14. 12. Coli C_5 24 Std. Z. T Bouillonagar ph 7,2. Garung in 0,5% Traubenzuckerlosung, CO_2-Atm.

Zusammenfassung.

Die Versuche über die Beeinflussung der Trockensubstanz zeigen, daß durch die Züchtung auf festen LiCl-haltigen Nährböden bei schwach alkalischer Reaktion eine Verminderung des Trockensubstanzgehaltes von 22,7 auf 18,6%, d. h. um rund ein Sechstel, eintritt. Die Zugabe von LiCl zum Nährboden wirkt also unter diesen Bedingungen auf die Organismen stark quellend. Es ist anzunehmen, daß diese Erhöhung des Wassergehaltes entscheidend fur die morphologischen Veränderungen ist. Die morphologischen Veränderungen sind, wie in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte, in erster Linie dadurch charakterisiert, daß eine erhebliche Vergrößerung der Zellen stattfindet, und daß die normale Teilung durch anormale Teilungsvorgänge abgelöst wird. Weiterhin konnte bei diesen Untersuchungen

gezeigt werden, daß mit der Volumzunahme eine Veränderung der Zellform verbunden ist; an Stelle der normalen Stäbchenform trat die Kugelform. z. T. trat an Stelle der festen Zellform auch eine amöboid bewegliche Form. Diese Erscheinungen lassen sich durch die nunmehr festgestellte Erhöhung des Wassergehaltes erklären. Es ist anzunehmen, daß mit der Zunahme des Wassergehaltes eine Erhöhung der Plastizität der protoplasmatischen Substanz, insbesondere der Grenzschichten. stattfindet, diese Plastizitätsänderung geht anscheinend so weit, daß die zur Aufrechterhaltung der normalen Stäbchenform notwendige Festigkeit unterschritten wird, die Organismen gehen aus der Stäbchenform in die Kugelform über, bei noch weiterer Herabsetzung der Viskosität muß es dann zur Bildung noch weiterer Abweichungen von der Normalform kommen, die sich in dem Auftreten amöboider Bewegung und der Ausbildung der anormalen Teilungszustände äußert.

Die durch die Erhöhung des Wassergehaltes zu erklärende Formänderung führt aber noch weiterhin zu einer erheblichen Verringerung der wirksamen Oberfläche durch den Übergang von der Stäbchen- (Zylinder-) Form zur Kugelform unter gleichzeitiger erheblicher Volumzunahme der Einzellebewesen. Bei den morphologischen Untersuchungen konnte z. B. festgestellt werden, daß Stäbchen von 3,2 : 1,2 μ Größe in Formen von 5,1 : 4,0 μ Größe übergingen. Für die Stäbchen ergibt sich dann bei zylindrischer Form ein Inhalt von 7,3 cμ bei einer Oberfläche von 21,7 qμ; legt man für die LiCl-Formen eine Kugelform von 4 μ Durchmesser zugrunde, so erhält man hier einen Inhalt von 34,6 μ^3 bei einer Oberfläche von 50,3 μ^2, bei Annahme der zylindrischen Form bei einer Größe von 5,1 : 4,0 μ ergibt sich eine Oberfläche von 87,5 μ^2 bei einem Inhalt von 62,5 μ^3. Das Verhältnis von Inhalt zu Oberfläche würde also bei den normalen Stäbchen 1 : 2,86, bei den anormalen Formen dagegen in beiden Fällen nur etwa 1 : 1,5 betragen. Da der Gasstoffwechsel weitgehend von der wirksamen Oberfläche abhängig ist, bedeutet dies, daß bei den unter LiCl-Einfluß gewachsenen Organismen eine weitgehende Herabsetzung des Stoffwechsels eintreten muß, wie sie auch durch die Versuche festgestellt werden konnte.

Die unter dem Einfluß von LiCl eintretenden Erscheinungen lassen sich zwanglos durch die durch LiCl ausgeübte Quellungswirkung erklären. Eine ähnliche Wirkung, wenn auch in schwächerem Maße, müßten die in der Hofmeisterschen Ionenreihe benachbarten Elemente ausüben, hier sei nur noch erwähnt, daß bei Züchtung auf kochsalzreichen Nährböden ähnliche Erscheinungen auftreten, die vielleicht in gleicher Weise erklärt werden könnten.

Nachdruck verboten.

Eine Universal-Zuchtapparatur.

[Aus dem Biochemischen Institut der Technischen Hochschule Graz.]

Von **Franz Fuhrmann.**

Mit 3 Abbildungen im Text.

Bei Stoffwechsel- und Umsetzungsversuchen mit Mikroben pflegt man meist flüssige Nährsubstrate oder Proben zu verwenden, weil dadurch die Möglichkeit geboten wird, in beliebigen Zwischenräumen gleichmäßig durchmischtes Material zu entnehmen und daran den zeitlichen Verlauf des Geschehens mit genügender Genauigkeit festzustellen. Dabei muß allerdings die Summe der entnommenen Teilmengen im Verhältnis zur ursprunglichen Flüssigkeitsmenge sehr klein bleiben. Solange dem Biologen und Biochemiker mikrochemische Methoden zur Untersuchung der Teilproben fehlten, mußte man mit sehr großen Ausgangskulturmengen arbeiten, die ganz besondere und umfangreiche Apparaturen erforderten, deren Sterilerhaltung keineswegs leicht war. Heute verfügen wir bereits über praktisch genügend genaue Mikromethoden zur chemischen Untersuchung, die Teilentnahmen von höchstens 1 ccm brauchen. Aus der Verwendung solcher Methoden heraus habe ich eine relativ einfache, genügend große und sehr vielseitig verwendbare Zuchtapparatur zusammengestellt, die außer den laufenden mikroskopischen Kontrollen auch die sterile Entnahme von kleinen Portionen der Kulturflüssigkeit gestattet und jede Analyse der Stoffwechselgase ermoglicht.

Das eigentliche Kulturgefäß bildet ein Jenaer Glaskolben von 2 l Inhalt, der für eine Kultur-Flussigkeitsmenge von 1500 ccm maximal ausreicht. Abbildung 1 zeigt denselben im Schnitt. Er besitzt die beiden seitlich oben angeschmolzenen Ansätze A und A_1, die unter Verwendung weiterer Einrichtungen zur sterilen Kulturentnahme und zur Einführung verschiedener Gase, wie Luft, CO_2, O, N und H oder davon hergestellter Gemische dienen und durch einfach gebohrte Kautschukstopfen (K und K_1) verschlossen sind. Der Verschluß des Kolbenhalses besteht aus einem gut sitzenden Kautschukstopfen mit 3 Bohrungen, wie K der Abb. 2 wiedergibt. In der Abb. 1 sieht man nur die Bohrung I von K der Abb. 2. In diese Bohrung gehört das Kugelrohr Ku (Abb. 1) zur Gasableitung.

Abb. 1.

Zum Zuchtkolben gehört die Einrichtung E zur Entnahme von Kultur-Flüssigkeitsproben. Wie die Skizze der Abbildung 1 zeigt, besteht sie aus dem durch den Kautschukstopfen K in die Kulturflüssigkeit beliebig tief und gasdicht eingeführten Winkelrohr mit der Abtropfspitze, die in der Glasglocke (G) mündet, welche unten nach Entfernung des Verschlusses b (bestehend aus dem Kautschukröhrchen mit dem eingesteckten Glasstäbchen) offen ist und oben seitlich den Ansatz a trägt, durch den Gas ein- oder austreten kann.

Durch den Stopfen des Kolbenhalses ist mit der Bohrung II (K in Abb. 2) die Impfeinrichtung angeschlossen, die in Abb. 2 wiedergegeben ist. Sie setzt sich aus der Glaskugel I zur Aufnahme der Nährflussigkeit und dem darauf angeschmolzenen Ansatz W und dem unten angesetzten Kapillar-U-Rohr C mit der Spitze s zusammen. Letztere ragt ein wenig über die untere Fläche vom Kolbenstopfen K vor, nachdem C in die Bohrung II luftdicht eingefügt ist. Die kugelige Erweiterung I nimmt ca. 2.5 ccm Flüssigkeit auf. Mit Hilfe der Bohrung III des Stopfens K (Abb. 2) kann noch ein Rührwerk in den Kolben gasdicht eingeführt werden.

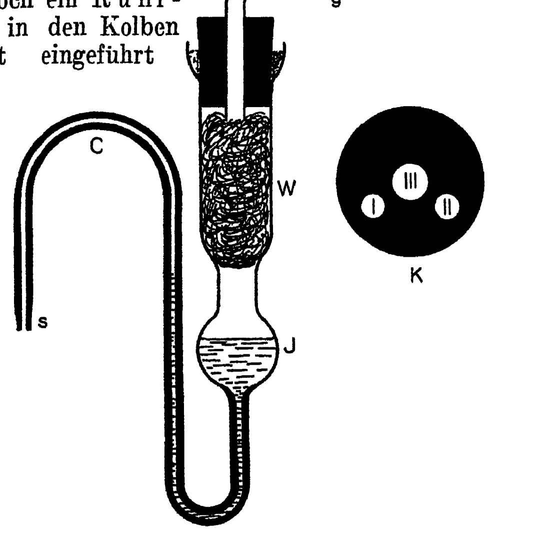


Abb. 2.

Abb. 3.

Das Rührwerk besteht aus dem gläsernen Rührer (R der Abb. 3), dessen in die Flüssigkeit ragendes Ende beliebig schaufelartig gestaltet werden kann. Wie Abbildung 3 erkennen läßt, wird der Rührer mit dem Kautschukstopfen K im offenen Rohr Z befestigt. Dieser Zylinder Z ragt in das Quecksilber-Ringgefäß Hg, dessen innere Rohrwand sich als Durchführungsrohr Z_1 fortsetzt und damit mit Hilfe der Bohrung III in den Kolbenhalsstopfen K (Abb. 2) eingeführt wird. Abbildung 3 zeigt die Anordnung mit Quecksilber gefüllt in halber Naturgröße. Die Höhe des Ringgefäßes ist so gewählt, daß selbst mit einem Überdruck von $^1/_{10}$ Atmosphäre im Kolben gearbeitet werden kann, ohne daß eine Gasausströmung erfolgt. Größere

Überdrucke kommen praktisch im Kulturgefäß kaum vor, wenn mit durchströmenden Gasen gearbeitet wird.

Zur vollkommenen Einrichtung gehören noch die Regulierhahngarnituren D und R der Abbildung 1, deren Funktion später mitgeteilt wird.

Für den Gebrauch wird der Kolben (nach Abb. 1) mit höchstens 1500 ccm Nährlösung gefüllt, der Ansatz A_1 mit einem Wattebausch verschlossen, durch den einfach gebohrten Kautschukstopfen K auf dem Ansatz A die Entnahmevorrichtung E angesetzt und der mit dem Kugelrohr Ku, dem Rührer (Abb. 3) und dem Impfrohr (Abb. 2) versehene Kautschukstopfen in den Kolbenhals dicht eingefügt. Der Ansatz a der Entnahme-Apparatur wird ebenfalls mit einem Wattebausch und der Ablauftrichter unter Zuhilfenahme des dickwandigen Kautschukröhrchens b mit dem Glasstäbchen verschlossen. In den Kugelteil des Impfrohres (I der Abb. 2) füllt man etwas über die Mitte Nährlösung und verschließt mit einem Wattebausch. Verwendet man den Kolben ohne Rühreinrichtung, so steckt man an Stelle desselben in die Bohrung des Stopfens einen gut sitzenden. leicht konischen Glasstab. Nunmehr wird in der üblichen Weise im strömenden Dampf fraktioniert sterilisiert. Hierauf verimpft man ein wenig der zu untersuchenden Mikrobenart in die Nährlösung des Impfrohres (Abb. 2) und bringt die Zuchteinrichtung in den Thermostaten mit der gewünschten Temperatur. Nach 24 Std. schaltet man die Verteilerhahn-Garnitur mit dicken Kautschukröhrchen nach dem Schema der Abbildung 1 an und armiert die Impfröhre nach Abbildung 2 mit dem durch den Kautschukstopfen gehenden Glasrohr G, dessen Verschluß wieder ein Glasstäbchen mit Kautschukschlauch bildet.

Nun drückt man durch Einblasen von Luft einige Tropfen von der im Impfrohr angegangenen Mikrobenkultur durch die Kapillare C in den Zuchtkolben. Damit ist die Impfung des Kolbens vollzogen.

Hierauf verfährt man nach den beabsichtigten Entnahmeproben etwas verschieden. Zur Untersuchung der beim Wachstum oder einer Gärung entstehenden Gase werden sie entweder freiwillig austretend bei den Ausströmröhrchen 1 und 2 bei entsprechender Stellung des Hahnes H_4 (Abb. 1) gesammelt oder in angefügten Absorptionsgefäßen, wie sie für die Mikroelementar-Analyse nach Pregl Verwendung finden, gebunden und in gewählten Zeitabschnitten gewogen. Dabei sind die Hähne H_1 und H_2 geschlossen und Hahn H_3 verbindet das Kugelrohr Ku allein mit dem Hahn 4 der Ableiteröhrchen.

Genauer sind die gasanalytischen Ergebnisse bei Durchleitung von CO_2-befreiter Luft oder bei Anaeroben von einem indifferenten Gas, wie Wasserstoff oder Stickstoff oder definierten Gemischen derselben mit Sauerstoff.

Ich möchte nur aufmerksam machen, daß Bombenstickstoff und -wasserstoff unrein sind und stets Spuren von Sauerstoff enthalten, die in ersterem Falle nicht einfach wegzubringen sind. Die erste chemische Reinigung wird bei der Überfüllung des Stickstoffes aus der Bombe in den Gasometer durch Durchleiten des Gases durch die alkalische Hydrosulfitlösung nach Kautzky-Thiele unter einem Druck von $^2/_{10}$—$^3/_{10}$ Atmosphären vorgenommen. Sehr bequem im Gebrauch sind die neuen Glasgasometer mit konstantem Ausströmungsdruck nach Hohl [1]). Vom Gasometer streicht der Stickstoff über reduzierte glühende Kupferspiralen unter Zwischenschaltung

[1]) Hohl, O., H., Ein Präzisions-Gasometer für konstanten Druck. (Mikrochemie. Bd. 13. 1933. S. 189.) Der Gasometer sowie die beschriebene Zuchtapparatur wird von der Firma Paul Haack, Wien IX, Garelligasse 4, erzeugt.

einer Waschflasche zur Zuchtapparatur und strömt unter sehr niedrigem Drucke durch einen Blasenzähler mit Hilfe des T-Rohres R in dieselbe ein.

Genaue Analysen der Stoffwechselgase erfordern eine Durchspülung der Kulturflüssigkeit mit dem Durchströmgase. Zu dem Zwecke bringt man die Hähne H_1 und H_2 in die Stellung nach Abb. 1. Der Gasstrom folgt der durch die ausgezogenen Pfeile angegebenen Richtung.

Für die sterile Flüssigkeitsentnahme drückt man bei geöffnetem Hahn H_1, geschlossenem Hahn H_2 und den den Ansatz a (Abb. 1) mit dem Ableiterohr V (Abb. 1) verbindenden Hahn 3 mit dem Durchströmgas Kulturflüssigkeit durch das Steigrohr s zur Ausstromspitze p der Entnahmevorrichtung E und fängt die abfallenden Tropfen nach Abnahme des Verschlusses b auf. Wenn die wenigen zur Untersuchung notwendigen Kubikzentimeter Flüssigkeit ausgeflossen sind, sperrt man den Hahn H_1, wischt den unteren Ausflußraum mit steriler, auf einem dünnen Holzstäbchen aufgewickelter Watte trocken, setzt den Verschluß b an, bringt den Hahn H_1 in die in der Skizze angegebene Stellung und öffnet den Hahn H_2. Das durch die Entnahmevorrichtung einströmende Gas drückt die von der Entnahme her noch im Steig- und Ausflußrohr befindliche Kulturflüssigkeit wieder in den Kolben zurück. Nunmehr gibt man den Hähnen die für den beabsichtigten Zweck notwendigen ursprünglichen Stellungen. So kann man in bestimmten Zeitintervallen den Kolbeninhalt ohne Störung der Versuchsanordnung oder die Reinzucht gefährdende Öffnung des Kolbens viele Male Proben zur biochemischen Mikroanalyse oder biologischen Untersuchung entnehmen.

Für die Gasentnahme sind deshalb zwei durch Hahn H_1 momentan umschaltbare Ausführungswege vorgesehen, um während der Verarbeitung der in dem einen Absorptionsgefäß aufgefangenen Gasprobe die Durchströmung durch ein zweites Rohr zu ermöglichen und dadurch die Beobachtung des Gasstoffwechsels kontinuierlich zu gestalten.

Zur Erreichung einer konstanten Zuchttemperatur kann man an Stelle eines Luftthermostaten auch ein Wasserbad mit selbstregulierender elektrischer Heizung verwenden. Wir benutzen dazu größere, mit Wasser gefüllte Glaszylinder, die auf einem heizbaren Kupferbleche aufgestellt sind. Der Kolben wird bis zum Halsansatz so eingesenkt, daß sich die Entnahmeeinrichtung noch außerhalb des Wasserbades leicht zugänglich befindet.

Zusammenfassung.

Es wird eine vielseitig verwendbare Zuchtapparatur beschrieben, die sowohl eine jederzeitige sterile Entnahme kleiner Mengen von Kulturflüssigkeit ermöglicht als auch die Erfassung und Analysierung etwa auftretender Stoffwechselgase gestattet.

Nachdruck verboten.

The Derivation of Asporogenous variants of a Spore forming organism. Part I. Colony forms and serology. Part II. Cytological observations.

[From the National Institute for Research in Dairying, University of Reading, England.]

By M. I. Christian.

With 12 figures in text.

Part I.

In the course of the study of a spore-forming organism isolated from sterilised milk [Hiscox and Christian (1)], it was found that characteristic vegetative cells arose during the sporulation process. These forms, although differing morphologically from the parent form, gave identical biochemical reactions. but could not be induced to sporulate. During cultivation over a number of years in the laboratory they showed no sign of ability to produce spores, and were therefore regarded as asporogenous strains. These forms grew vigorously and it was shown that if a sporing culture were transferred to fresh media their rapid development had an inhibitory influence (1) on the germination of the spores, which were steadily lost by dilution during subsequent cultivation. The only way of preserving sporogenous cultures was to destroy the asporogenous forms and or their growth products, since the spores. with their lag-phase before germination, could not compete with these rapidly growing cells. Heating was found to be the most suitable method and it became the general routine, therefore, to heat all sporogenous cultures at 100° C. for 30 minutes when subculturing. The spores, freed from the inhibition, developed normally and produced a new generation of spores.

It was repeatedly noticed that if a sporogenous culture, incubated at 22° C. (the optimum temperature for spore formation), were plated at any time after the third day of growth two types of colony developed. These were quite distinct from one another, the one being round and opaque, the other irregular and transparent. Microscopical examination showed them to be made up of sporogenous and asporogenous forms respectively. The asporogenous colony form was stable and could be propagated indefinitely without losing any of its characteristics. The sporogenous colony, on the other hand, was unstable and invariably gave rise to both types. On propagation both types developed at first, but here again, unless the spores were freed from the influence of the asporogenous forms, the asporogenous type of colony rapidly became dominant.

Later work showed that two types of asporogenous form could be distinguished. These were distinct from one another in that the one was non-motile and stable whilst the other was motile and unstable, gradually changing over into the stable form.

The three forms of this organism have been examined in greater detail and the results are presented below.

Eight strains of the organism were used. These were isolated from different samples of tainted milk, but in the course of the work they were found to be so similar that one strain, "So", was selected and studied more closely. The pure cultures used in this work were obtained by plating and selection of colonies, after it had been shown in earlier work that spores isolated by a modified Barber method gave rise, after boiling, to cultures having characters identical with those secured by plating and selection.

Colony Forms.

Type I. The Sporogenous Form. Growth on Nutrient Agar Plates.

Beginning with an inoculum of spores which have been heated, the colonies which develop after incubation at 22° C. for 12 hours are round, 1.5—2 mm. in diameter and almost transparent. They consist at this stage of granular bacilli. After a further 36—48 hours the surface of the colony becomes opaque and refractile, a change which is associated with the formation of the spores (Fig. 1). Microscopical examination at this time shows, in the main, rods bearing typical spores. There is, however, a small proportion of cells which do not bear spores and which can be recognised as typical cells of the asporogenous form. All evidence goes to show that this form arises at the time that the new spores first appear, but this point is discussed in more detail in Part II.

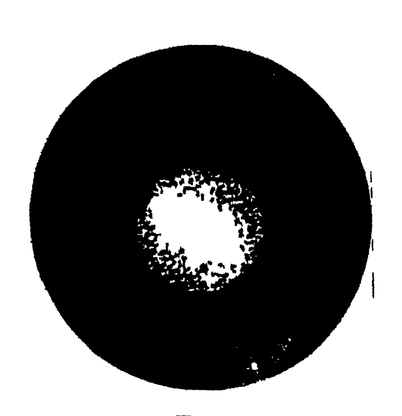


Fig. 1.



Fig. 2.

Figs. 1—4. Type I colony on Nutrient Agar after incubation at 22° C. for 2, 3, 8, and 21 days respectively (30 ×). (Fig. 2—4 are stages of the same colony.)

The colony remains in this state until the fifth day, when small transparent areas appear towards the centre and a zone of transparent growth forms at the edge (Fig. 2). With continued incubation the internal areas increase in size until the colony has the typical eroded appearance. At the same time the surrounding zone spreads outwards as a thin film until a final diameter of 3—5 mm. is reached (Fig. 3 and 4). Smears from the outer area and from the eroded areas inside the colony show asporogenous forms and occasional free spores.

The opaque parts are made up almost entirely of free spores.

The obvious interpretation to be put on these results is that the development of the sporogenous colony is divided into three phases, (a) the germination of the spores and vegetative multiplication, (b) the development of the spores, and (c) the development of the asporogenous form. The whole process is very similar to that which has been described for B. anthracis by Preisz (2) and Eisenberg (3) or more precisely, to the "B" form described by Bordet and Renaux (4), in which a variant is produced in the form of secondary colonies within the parent colony. The development of the variant in the present organism is much more pronounced in that not only does it make its appearance within the parent colony, but it entirely undergrows it, even spreading out for some distance from the edges. The very similar eroded appearance in B. anthracis colonies was found by Preisz (2) and later by Daranyi (5) to be associated with a lytic process. Repeated efforts have been made to demonstrate a similar process in the present organism. Filtrates have been prepared from the eroded areas but none has shown any lytic properties whatever. Closer examinations of the deve-

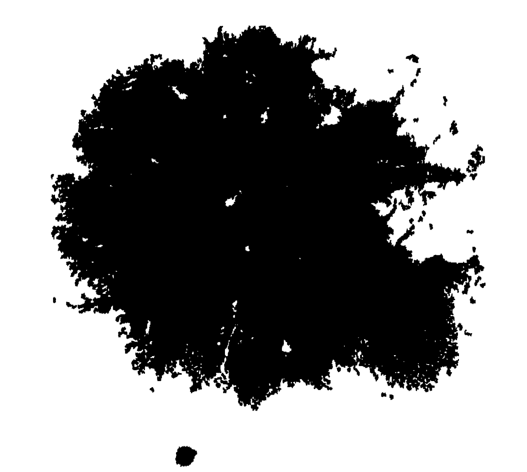


Fig 3.



Fig. 4.

lopment of the colony have led to the view that the 'erosion" is brought about by purely mechanical means, namely, the spores are displaced or swept aside by the active growth of the underlying asporogenous form. The coiled or convoluted character of the Type II growth, as will be seen, is particularly suited to such an action.

Growth in Nutrient Broth. (pH 7.0.) There is strong and uniform turbidity during the first three days at 22° C. Later, the growth sinks to the bottom of the tube in the form of a gelatinous precipitate. This is probably associated with the rise of the asporogenous forms after the third day and may be sedimentation. not salt agglutination.

Morphology. The cells are granular bacilli (3.5—4.5 $\mu \times 0.75\ \mu$) forming large, subterminal spores. In the sporulating state they have every appearance of a clostridium of the Cl. sporogenes type. The spores are oval or cylindrical and vary from 2.25—3 $\mu \times 1.25\ \mu$.

Staining Reaction. The Gram-reaction is negative at all stages.

Motility. Motility and flagella have never been demonstrated.

Heat Resistance. The spores will withstand heating at 100° C. in milk for 2½ hours but are killed after 3 hours.

Saline Agglutination. Using Wilson's method (6), suspensions are found to be stable in solutions containing from 0.12—4% NaCl.

Type II. The Stable Asporogenous Form. Growth on Nutrient Agar Plates.

Incubated at 22° C., the colonies are moist, transparent and bluish. The surface is convoluted and gives a stippled appearance by transmitted light and a typical "frosted" or "watered silk" appearance by reflected light. The edge is coiled and irregular, and spreads outward until the final diameter of the colony is 3—5 mm. It is a typical Medusa-head (Fig. 5) and in this strongly resembles the colonies produced by certain forms of B. anthracis and B. subtilis. The resemblance is particularly strong in the case of forms of B. anthracis described by Preisz (2) in which sporulation was much reduced, and those described by Eisenberg (3) and Bordet and Renaux (4) in which it was absent. It



Fig. 5. Type II colony on Nutrient Agar. 22° C. for 48 hours (30 ×).

is interesting to note that the B. anthracis cultures were also highly stable in the asporogenous state.

Growth in Nutrient Broth. There is turbidity during the first 24 hours at 22° C., then the growth flocculates and sinks to the bottom of the tube as a gelatinous precipitate. This may be agglutination, but in view of the fact that a similar flocculation does not occur in salt solutions it is more probably due to gravitation encouraged by the coiled nature of the chains in which the organism

Morphology. The rods are slender and granular (2.25—6 × 0.75 μ) occurring in chains of varying length (Fig. 6). The chains are frequently coiled. Polar granules are marked. The whole appearance of the culture is strongly suggestive of a lactobacillus.

Staining Reaction. The Gram-reaction is negative.

Motility. The organism is apparently non-motile and flagella have never been demonstrated.

Saline Agglutination. Sedimentation but no typical agglutination occurs in solutions containing 0.12—4% NaCl.



Fig. 6. Smear from Type II colony 22° C. for 48 hours. Methylene blue (1000 ×).

Type III. The Unstable or Mucoid Asporogenous Form.

This form was first isolated from the eroded areas of a sporogenous colony but it has since been found in many asporogenous colonies where it occurs as an area of mucoid growth extending outwards from the edge. It can be distinguished from the surrounding convoluted growth by its amorphous structure. Pure cultures may be obtained by repeated plating and selection of colonies but subsequently, particularly if cultures are allowed to age, they revert to the stable form, Type II.

Growth on Nutrient Agar Plates. The growth is bluish and transparent, mucoid and semi-fluid. Young colonies are transparent with an entire edge, but they soon spread out in an amoeboid manner (Fig. 7). This is probably connected with the fact that after incubation at 22° C. for 48 hours the organisms are very actively motile and, with a lens or the low power of the microscope, can be seeen to be moving about with extraordinary rapidity in the fluid inside the colony. This lasts for 48 hours during which time considerable spreading occurs. In its final state the growth is glassy and homogenous and clearly distinguishable from the convoluted stable form.

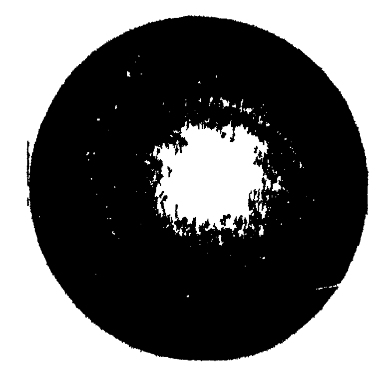


Fig. 7. Type III colony on Nutrient Agar. 22° C. for 48 hours (30 ×).

Very similar mucoid forms have been

described for B. anthracis by Preisz (2) and Bordet and Renaux (4). The latter workers noted them in connection with asporogenous variants.

Growth in Nutrient Broth. There is uniform turbidity with, later. some precipitation and clearing of the medium but no flocculation similar to that in Type II.



Fig. 8. Organisms showing "beaded" forms. Stained by Giemsa's method (1000 ×).

Morphology. The rods are granular (2.25—4 × 0.75 μ) occurring singly and never in chains. They do not appear to be capsulated but to be embedded in a mucilaginous substance.

Staining Reaction. The Gram-reaction is negative.

Motility. The cells are actively motile by means of 6—10 peritrichous flagella.

Saline Agglutination. No typical agglutination occurs in solutions containing from 0.12—4% NaCl.



Fig. 9. Fig. 10.

Fig. 9 u. 10. Cells showing the partition of the secondary granule and stages in abstraction. Stained by Giemsa's method (1250 ×).

Serology.

Serological experiments were designed to examine

(1) whether the three forms of this organism were antigenically related to one another; and,

(2) whether the organism, although unidentified, was antigenically related to the aerobic or anaerobic spore formers.

Technique. The growth was centrifuged from broth cultures incubated at 22° C. for 3 days, washed twice in sterile distilled water and suspended in 0.1% formaldehyde solution. A large stock suspension was prepared in each case, so that the same antigen might be used for the immunisation of rabbits as for the subsequent agglutination and absorption tests. The formalised suspensions were used for agglutination but fresh unformalised suspensions had to be used for absorption. Antigen and antiserum for B. subtilis (a typical aerobic spore former) were prepared in the same way and used throughout the work for control.

The suspensions were standardised to contain approximately 400 million organisms per 1 ml. and divided into two portions, one of which was heated at 100° C. for 1 hour. Rabbit sera were prepared, in the usual way, with heated and unheated suspensions the eight inoculations being given.

Agglutination was carried out by Dryer's technique, with a final working concentration of 0.12% NaCl, and the tubes incubated at 42° C. for 4 hours. The results were read after a further 20 hours in the ice chest.

For absorptions fresh unformalised suspensions were prepared in exactly the same way. A concentration of 2000 million organisms per 1 ml. was used with a serum dilution of 1/100. The tests were put up in sterile tubes, sealed with rubber stoppers, well shaken and incubated at 42° C. for 30 min. They were then stored for 24 hours in the ice chest, the serum separated and titrated against the stock suspension.

The results of cross-agglutinations and cross-absorptions with Types I, II and III are shown in Tables 1 and 2.

Table 1. Cross Agglutination of Types I, II and III.

Serum	Suspension	Anti-serum of (unheated) organism. Suspension (unheated)	Anti-serum of (unheated) organism. Suspension (heated)	Anti-serum of (heated) organism. Suspension (unheated)	Anti-serum of (heated) organism. Suspension (heated)
I	I	1,600	1,600	800	400
	II	12,800	12,800	—	1,600
	III	3,200	3,200	—	800
	B. subtilis	—	—	—	—
II	I	1,600	1,600	—	800
	II	>51,200	25,600	6,400	3,200
	III	3,200	3,200	—	1,600
	B. subtilis	—	—	—	—
III	I	3,200	1,600	—	400
	II	25,600	6,400	—	>3.200
	III	6,400	3,200	—	800
	B. subtilis	—	—	—	—
B. subtilis	B. subtilis	800	—	1,600	—

Table 2. Cross Absorption of Types I, II and III.

Serum	Titre	Titre after absorption by Type I	Type II	Type III
I	1,600	<250	<250	<250
II	>51,200	tr. 500	<250	tr. 500
III	6,400	tr. 250	tr. 250	<250

These results show that the three forms are antigenically closely related to one another and suggest that the asporogenous forms (Types II and III) are probably variants of the parent sporogenous form (Type I).

It is interesting to note that the loss of the power of spore-formation is apparently correlated with an increase in agglutinability, since Type III, which is intermediate and unstable, shows an increase over Type I, whilst Type II, the stable form, shows a still further increase.

There appears to be a gradation in antigenic characters from Type I, through Type III, to Type II, which suggests that neither variant is really stable.

Previous work had failed to identify this organism. In some respects it closely resembled the anaerobic spore formers but never sufficiently

closely to allow of its being called an anaerobe. On the other hand, considered as an aerobic spore-former, it presented very atypical cultural reactions and these, taken in connection with the ability to sporulate in milk, a property which true aerobic spore formers do not appear to possess, suggested that it could not rightly be assigned to this group either. An attempt was made to investigate this further.

It was however found that Type I serum failed to agglutinate suspensions of seven different anaerobes including Cl. sporogenes and Cl. Histolyticum and four aerobes. B. subtilis, B. megatherium, B. mycoides and B. mesentericus.

Part II.

Cytological observations.

Preliminary studies of the cytology of the organism had shown that the process of sporulation involved a constant series of changes in the character of the cell contents [Christian (10)]. The significance of these was not clear at the time but it was obvious that the process presented interesting features, and later work having shown that sporulation was intimately connected with the rise of variants, it was decided to study the process in greater detail.

Milk is the medium in which sporulation is at an optimum. Spores are formed in agar and broth media but the total number is small, and the organism are only about half the size of and much less vigorous than those grown in milk. The internal changes which occur in the cells can be clearly followed with milk cultures; hence, unless it is specially mentioned, all the following observations have been made on organisms grown in milk. The procedure adopted was to inoculate a sporing culture into milk and heat at 100° C. for 30 minutes to destroy the asporogenous forms and secure a constant starting point, namely, an inoculum of spores capable of germinating and producing a new generation of spores.

The optimum temperature for sporulation is 22° C. and at this temperature the spores are most numerous and the "spore cycle", i. e. the interval between the germination of the original spores and the formation of the new is only three days. At lower temperatures sporulation takes place slowly, and although the numbers of spores produced are smaller the individual organism are larger and more vigorous. As a general rule 22° C. was the temperature used in this work.

The technique of examination consisted of centrifuging 5 ml. of the milk culture and making microscopical preparations from the deposit. Smears were stained by Giemsa's and a variety of other well known methods, e. g. Gram, Moeller's spore stain, methylene blue, etc. The results were the same in all cases, but with Giemsa's the internal structure was more sharply defined and therefore more suitable for photographic purposes.

Cultures incubated at 22° C. were examined at 12 hour intervals during the first three days and afterwards at 24 hour intervals until the seventh day. Rapid and almost uniform germination of the spores took place during the first 12 hours and an actively dividing vegetative phase ensued, in which the cells showed dense, homogenous, deeply staining protoplasmic contents, Fig. 11 (1).

Later the contents became less dense, and as the time for spore formation approached, distinctly granular. After 24—36 hours an unstained

area could be observed lying towards one end of each cell, cutting off and isolating and fixing the position of a terminal portion which later observations showed to be the potential spore, Fig. 11 (2). The remainder of the cell contents underwent definite contraction and finally condensed to form a second granule, Fig. 11 (3 and 4). The appearance of the organism at this stage was quite characteristic. The body of the organism was unstained although a faint outline of the cell wall could be seen, and the cell contents were concentrated into two deeply stained granules, one of which was terminal, the other in a variable position in the cell. The curious "beaded" appearance which this gave to the organisms is seen in Fig. 8. It has been found convenient to distinguish between the two granules by calling them the "terminal" and „secondary" granules respectively. It should be noted that the culture at this stage was absolutely uniform, every organism showing either the "beaded" or a slightly earlier phase.

Following immediately on this there was rapid development of the terminal granule which resulted in the formation of the spore. The granule began to lose its deeply-staining character and became surrounded by a clear unstained wall, thin and permeable to stains at first, but later, when the spore matured, thick and resistant to all ordinary stains. The position of the secondary granule during this period varied somewhat in different cells. In a certain proportion of cells it was oval and lens-shaped and lay closely adjacent to the terminal granule Fig. 11 (5), and it was in such cells that the first traces of the spore wall could be observed. Actual contact between the two granules has not been observed, but it is possible that the secondary is a factor in the change-over from the terminal granule to the spore since once this was complete, the function of the secondary appeared to be at an end and it redispersed throughout the body of the mother cell Fig. 11 (6).

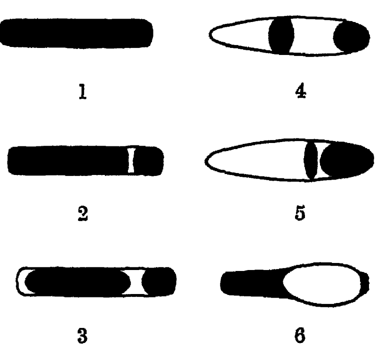


Fig. 11.

Coincident with the formation of the spore wall slender rods with granular protoplasm made their appearance in the culture. Although this new type of cell occurred at first only in small numbers, it could be recognised as the asporogenous variant. The numbers increased up to the seventh day by which time the development of the culture was complete. Plate cultures made at this stage showed a corresponding proportion of colonies typical of the stable asporogenous variant, thus confirming the microscopical evidence.

In brief, the foregoing observations demonstrated that a constant series of changes preceded the formation of the spores and that the asporogenous variant arose at the stage where the terminal granule was transformed into the young spore.

These observations were carried further by using cultures incubated at temperatures below 22° C. In these the sporulation process was retarded and the organisms were larger and more suitable for cytological observation. A temperature of 15° C was chosen as specially convenient.

The same sequence of changes occurred but observations of the "beaded"

forms at this temperature showed that the secondary granule was frequently not a single entity as observations at 22° C had suggested, but was made up of four distinct parts arranged in the form of a tetrad, Fig. 12 (1). As a general rule it lay midway between the terminal granule and the end of the cell, but sometimes the quadrants were slightly separated, two towards the terminal granule and two towards the end of the cell. Fig. 12 (2). Closer examination of such cells showed that there were frequently two indentations in the cell wall midway between the halves of the granule Fig. 12 (3) c. f. Figs. 9—10. Later stages showed forms in which the constriction was more pronounced and in which the two parts of the organism were connected only by a thin neck of protoplasm Fig. 12 (4). This suggests that the cell is severed into two parts Figs. 12 (5) and 10, a theory which is strengthened by the fact that from this stage onwards characteristic cells bearing no spore appear in the culture together with those bearing the spores. Moreover, in hanging drop preparations made at this stage, numerous cells showing the constriction can be seen, and the separation of the cell into two segments, only one of which was bearing a spore, has been actually observed. On the basis of this evidence it may be construed that the organism divides into two parts which differ fundamentally from one another in that while one contains half of the secondary granule the other contains, in addition, that part of the cell contents which forms the terminal granule. One part, therefore, would bear none of the material which formed the terminal granule or potential spore, and, lacking this essential factor, would be unable to sporulate. This inability to form spores is so eminently a characteristic of the asporogenous variant that it is perhaps a legitimate speculation that the incomplete part of the original cell is the variant.

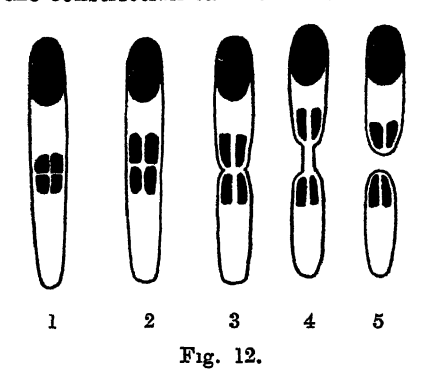


Fig. 12.

It is recognised that fixation and staining of films is liable to give rise to artifacts from which false conclusions may be drawn; in other words, there is no guarantee that stained preparations afford a true picture of the structure of the living organism. The "structural" details here recorded have been observed repeatedly and can be reproduced at will with any of the staining methods used. Hence, if they are artifacts they are a constant series of artifacts, probably not without significance. Moreover, careful parallel observations were made at all stages using Stoughton's modification of Nakanishi's wet fixation method (11) and direct and dark ground illumination of living cultures. With direct illumination, such details as tetrad formation could not be seen, but the aggregation of the cell contents into positions approximating to those of the stained preparations was clearly distinguishable although the aggregates were visible as areas of increased density within the cell rather than as sharply defined granules. That these masses had the optical properties of granules was shown by the fact that they appeared as brightly lighted spots in the body of the cell under dark ground illumination. When unfixed films were prepared by

the wet fixation method, pictures very closely resembling those of the fixed and stained preparations were also obtained. It was concluded. therefore, that the series of changes recorded for the stained preparations had a counterpart in those which actually take place in the living organism.

This organism affords a striking example of the rise of an asporogenous variant from a spore-forming organism. The spore form has not been identified with any previously described spore-former, in fact, it appears to have few characters in common with either the aerobic or the anaerobic groups of spore-formers. The variant is stable and, considered apart from the spore form, would be accepted on morphological and cultural grounds as a typical lactobacillus. This is particularly interesting in view of the work of Horowitz-Wlassowa and Nowotelnow (12) on a spore-forming lactobacillus.

Variation is throwing new light on the inter-relationships of the bacteria, and with the rapidly increasing knowledge of the production of asporogenous variants by spore-formers a suggestion that all bacterial species, even the non-sporing types, have their origin in forms which are capable of producing spores, is less fantastic than it once seemed, and accords with a similar suggestion which has been made with regard to the origin of the Fungi Imperfecti (13). Organisms which are so widespread as the bacteria and yet reproduce indefinitely by fission with no provision for renewal of the stock by means of a resistant or dormant phase, are at variance with general conceptions of living organisms.

It is possible that the non-spore forming state is not a natural one but an adaptation to artificial conditions. The complicated life cycles now being described for some non-spore forming organisms are highly suggestive of an attempt to revert to natural forms.

Summary.

A spore-forming organism has been shown to produce two asporogenous variants, one of which is stable, the other unstable, gradually changing over into the stable form.

Characteristic colony forms are associated with the three types, which closely resemble colony forms described for other spore formers, notably B. anthracis.

Serological examination has shown that the three forms are so closely related as to afford further evidence that the asporogenous forms are variants of the sporogenous form.

Efforts to identify the organism with well known aerobic and anaerobic spore formers by serological methods were unsuccessful.

The occurrence of a constant series of internal changes during the sporulation of the organism is demonstrated. Certain reorganisations of the cell contents appear to accompany the rise of the asporogenous variants.

My thanks are due to Dr. A. T. R. Mattick and also to Miss E. R. Hiscox for her constant interest and encouragement in the cytology. I am indebted to N. Gruber for making some of the photomicrographs and to Capt. S. R. Douglas F. R. S. for securing the preparation of others.

References.

1. Hiscox and Christian, Journ. Dairy Res. Vol. 3. 1931. p. 106. — 2. Preisz, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 58. 1911. S. 510. — 3. Eisenberg, Ibid. Bd. 63. 1912. S. 205. — 4. Bordet and Renaux, Ann. Inst. Pasteur. Vol. 45. 1930. p. 1. — 5. Daranyi, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 102. 1927. S. 326. — 6. Wilson, Journ. Hyg. Vol. 30. 1930. p. 40. — 7. Christian, Nature. Vol. 126. 1930. p. 683 — 8. Stoughton, Proc. Roy. Soc. B. Vol. 105. 1929. p. 469. — 9. Horowitz-Wlassowa and Nowotelnow, Zentralbl. f. Bakt. Abt II. Bd. 87. 1933. S. 331. — 10. Ramsbottom, Journ. Quekett Microscopical Club. Vol. 16. 1933. p. 261.

Nachdruck verboten.

The Origin of New Types of Imperfect Fungi from Interspecific Co-cultures[1]).

[From the Division of Plant Pathology, College of Agriculture, University of California Berkeley, California, U.S.A.]

By **H. N. Hansen** and **Ralph E. Smith.**

With 6 figures in the text.

In an earlier paper (3) we presented experimental data to show that in Botrytis cinerea and some other imperfect fungi, when several successive series of single-spore cultures were made of a number of strains or isolants, on the same medium and under similar conditions, some strains remained stable and uniform while in others (See Fig. 1, A) variants continued to appear in each culture series[2]). Experiments were described which indicated that such variation was due to the presence of genetically dissimilar factors in single cells or spores and that such heterogenic cells or conidia could be produced in vitro by mixing and growing together two different homogenic strains of B. cinerea. As an explanation of this we suggested the conditions of "heterocaryosis" (genetically dissimilar nuclei in the same cell) brought about by anastomosis between multinuclear hyphal cells of different strains. Since then we have experimented along similar lines with many other strains of B. cinerea and found that in all cases it was possible by mixing cultures, to bring about combinations of different homogenic strains in single cells or spores and then to segregate them again by successive series of monospore cultures. Single-spore series (usually composed of 20 cultures each) from such combinations show 3 general types of organisms, 2 identical with the parents and a third type the individuals of which vary in appearance, but in general are intermediate between the 2 parent strains. Subsequent single-spore series of cultures from the intermediates again produce all 3 types, whereas successive series from the parental types produce the same types only.

---

[1]) The term "co-culture" is used to designate an intentional mixture or combination of different types of organisms in one culture, and is preferred to "mixed culture" which carries the idea of an accidental mixture or contamination.

[2]) In the paper referred to the successive generations of cultures were designated by the symbols F_1, F_2, etc. This is of course a misnomer when applied to fungus culture generations. Hereafter the term culture series (CS_1, CS_2, etc.) will be used to denote successive sets of cultures initiated by single-spore transfers.

The results of such experiments in combining and segregating related fungus strains indicate that, if heterocaryosis is the correct explanation, genetically different nuclei can exist in the cells of the thallus or colony as a whole without disturbing the genetic integrity of each other (See Fig. 1, B).

Interspecific combinations.

In order to obtain further evidence upon this subject we decided to attempt, by the same method of mixed cultures, to bring about combinations of distinctly different species of Botrytis. Davidson et al (2) working with dermatophytes used the presence or absence of anastomosis between fungi of this group as a criterion of specificity. If two forms anastomosed they were considered to be of the same species and if not, they were assumed to be distinct species. Matsumoto (6) in his experiments with Rhizoctonia drew similar conclusions. Forstenreichner (3) named a new species of Rhizoctonia mainly on the basis of nonfusion between the fungus he isolated and the morphologically similar Rhizoctonia solani. Köhler (5) in his rather extensive work on anastomosis found that hyphae of Botrytis allii and of B. narcissicola would come in contact with one another but that it was questionable if protoplasmic fusion took place. His drawings do not show open channels between the specifically different hyphae. He says: „Zur Bildung der breiten, deutlich erkennbaren Plasmaanastomosen kommt es in keinem Fall. Gesetzt den Fall, es würden zwischen artverschiedenen Partnern Plasmaanastomosen vorkommen — was keineswegs sichergestellt ist . . . , so müßten die Fusionskanäle jedenfalls äußerst eng sein.“ Brierley (1) states that in mass isolations from soil he observed fungi of different species and even of different genera to anastomose. He does not state what species and genera were under observation.

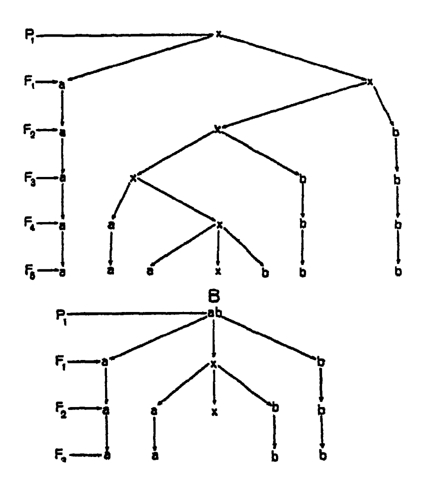


Fig. 1.

A. Behavior of the progeny of a single heterogenic conidium of B. cinerea through 5 single-spore culture series, showing the separation of the homotypes a and b from the heterotypes x. The chart represents a total of 650 single-spore cultures.

B. Behavior of the progeny of the combination culture of homogenic strains a and b of B. cinerea through 3 single-spore series, showing the production of heterotypes x and subsequent reappearance of homotypes a and b. The chart represents a total of 1,180 single-spore cultures. (After Hanson and Smith, 1932.)

For the present work the types of fungi selected for the attempted interspecific combination were two forms of Botrytis which are probably as distinct and as constant as any which can be found in that cosmopolitan genus. These were B. allii Munn. and B. ricini Godfrey. These species are of quite different types, appearance, and microscopic characteristics.

B. allii (Fig. 2, A) has a dense, felt-like growth of a smoke-gray color. The sporophores are short and sparsely branched. The conidia are elongated and somewhat pointed at both ends (Fig. 3, a). B. ricini (Fig. 2, B) grows in a loose, cobwebby or wooly mass of brownish or slightly yellowish gray color. Sclerotia are much more abundant and conspicuous than in B. allii. The sporophores are very tall and always dichotomously branched. The conidia are globose (Fig. 3, b). Both species have been in culture in the laboratory for more than a year and during that time have been transferred by single-spore methods many times. Previous to the attempt at combining them B. allii had been carried through 14 culture series while B. ricini, which had been in culture for over 2 years, had been carried through 38 such single-spore series. During all this time no variation had been apparent in either species.

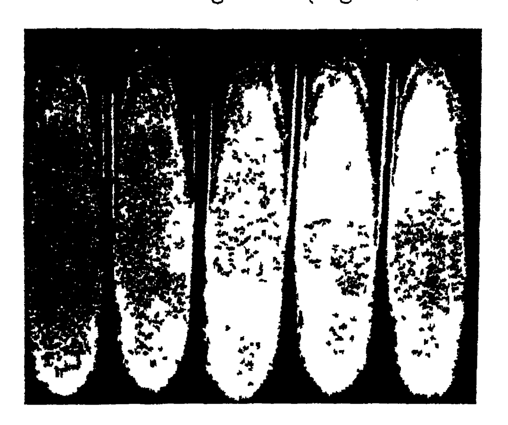


Fig. 2. A. Five tubes from a single-spore culture series of B. allii.

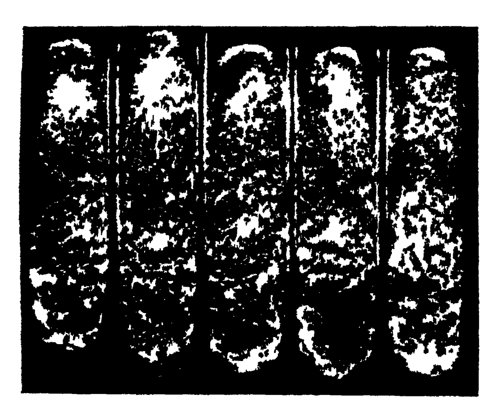


Fig. 2. B. Five tubes from a single-spore culture series of B. ricini.

Investigational methods.

In any experimentation on variation in fungi and its causes the genetic purity of the types used and their stability under a given environment are of the utmost importance. From what has been shown in our former paper about the results of making many successive single-spore culture series of B. cinerea it is apparent that merely starting from single spores does not insure genetic purity or uniformity in the resulting cultures, since such spores may or may not be homogenic (See Fig. 1, A). To obtain genetic purity in the fungi used in this work the procedure was as follows: From a culture which originated as a single-spore isolation 20 single-spore cultures were made. If all of these appeared identical one was selected and from this another series of 20 was made. This was repeated 5 times using the same medium (potato dextrose agar) and under approximately uniform laboratory conditions. If during these 5 successive single-spore series, no aberrant cultures appeared the fungus was considered genetically pure. If, on the other hand, say in the second series, 18 were alike and 2 variants appeared, then 20 single-spore cultures were made from one of the 18 and 20 from each of the 2 variants. No strains were considered pure from the standpoint of this work until all their sub-cultures remained constant through

5 consecutive single-spore series. For greater assurance of stability and complete adaptation to a given environment the fungi used for experimentation were allowed a further period of 6 months to thoroughly adapt themselves to the laboratory environment. During this period they were transferred frequently (at intervals of 20 days or less).

All the cultures referred to in this paper are single-spore cultures except where attempts were made to combine 2 forms. In the latter case small amounts of conidia and mycelium of each of the strains were thoroughly mixed in warm melted agar and from this tubes of agar were inoculated. The technique of single-sporing and other methods are described in detail in our previous paper. The tedious but all-important work of culture making was all performed personally by the senior author, in order to obviate as far as possible any possibility of error or irregularity from this source.

To more readily demonstrate anastomosis between the two species spores of B. allii were allowed to germinate for about 18 hours in potato dextrose broth on slides then spores of B. ricini were added and after an additional 12—18 hours the cultures were fixed and stained with cotton blue.

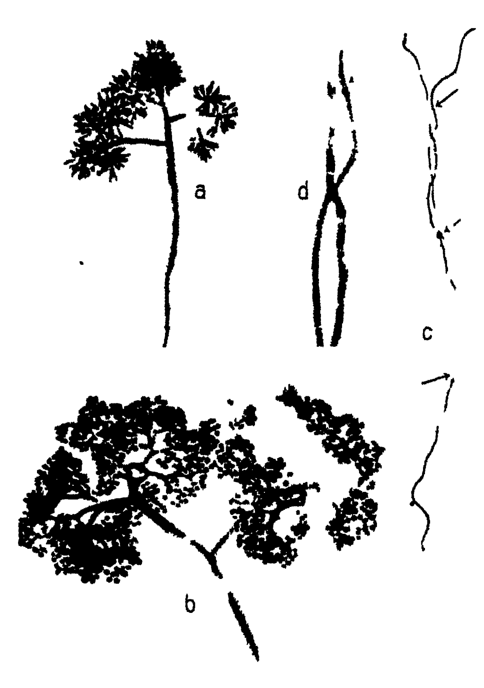
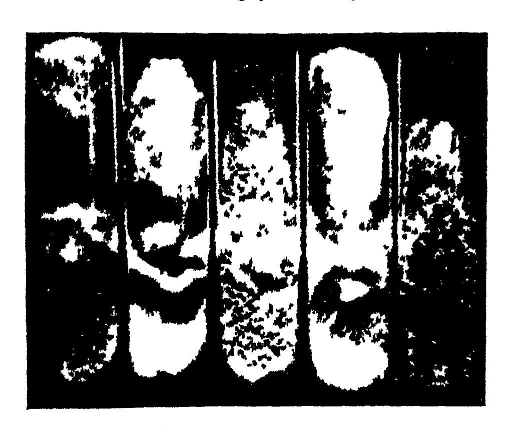


Fig. 3. a. Typical sporophore of B. allii. b. Part of typical sporophore of B. ricini. c. Anastomosis between B. allii and B. ricini. Arrows point to spore of B. allii (slightly out of focus); spore of B. ricini and point of anastomosis. d. Portion of c, showing anastomosis, more enlarged.

Results of interspecific culture combinations.

In attempting to combine these types a co-culture was made according to the method given above and when this culture was 12 days old, 20 single-spore isolations were made. These spores were taken from points where growth areas of the 2 fungus species could be seen to be in intimate contact. Otherwise, if spores were taken from typical-appearing areas of either species, pure cultures of that species usually resulted. Of the 20 cultures just mentioned, 6 appeared identical with B. allii, 9 resembled B. ricini, while the other 5 were strikingly different from either parent. Twenty monospore cultures were made from one of the variants and these were all unlike the original parents. Five of these cultures are shown in Figure 4, A. Three of these cultures (Fig. 4, A, a, b, c) were repeatedly single-spored in an attempt to segregate constant new strains. During the purification process other unusual forms were observed but discarded in order to keep the

amount of single-sporing and culturing within practical limits. Three typical strains which were selected as a result of this work are shown in Figure 4, B and Figure 5. A and B: these types have remained constant through 5 successive single-spore series of 20 cultures each. Strain 4 B is a derivative of 4 A, a. Its habit of growth is somewhat characteristic of B. ricini, but it differs strongly in its yellow color and absence of sclerotia. Strain 5 A was derived from 4 A, b which it resembles. Its characteristic profuse mycelial growth, yellowish-brown color and lack of sclerotia differ greatly from either parent. Strain 5 B was obtained from 4 A, c. In this type growth is slow and compact, with a dense, dark-colored centre and sclerotial crust beneath, surrounded by a white zone grading into a tan-colored area toward the margins. That this strain is quite unlike either parent may readily be seen from the illustration.



a b c d e

Fig. 4. A. a—e. Tubes from the second culture series from the mixed culture of B. allii and B. ricini.

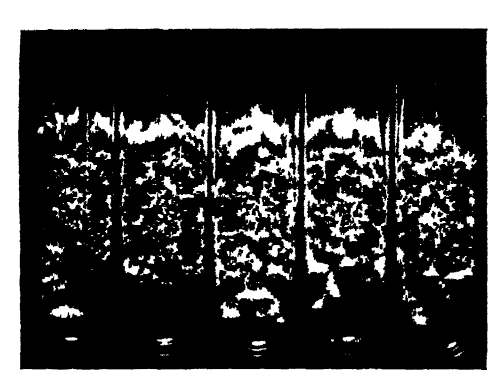


Fig. 4. B. Cultures of purified, new homotype derived from 4 A, a.

It may be noted here that, in all the cultures derived from the variants obtained from the inter-specific combination, no types entirely like either of the original parents have appeared. This is unlike the case with variants from inter-strain combinations (see Fig. 1. B) where the original homotypes a and b were continually produced in successive cultures from heterotypes x. It is likewise worthy of note that, while all these variants and their derivatives differ definitely from the original species B. allii and B. ricini, a survey of all the variants which have been obtained from this combination strongly suggests in a general way resemblance to ricini far more pronounced than to allii. No variant having any similarity whatever to the very characteristic appearance of B. allii has been observed but all degrees of resemblance to B. ricini are encountered. This fact suggested an examination of the sporophores of the variants for comparison with the parent forms. Figure 6 shows conidiophores of 4 of these types, all photographed to the same scale as the sporophores in Figure 3. The resemblance to B. ricini (Fig. 3, b) rather than to B. allii (Fig. 3, a) will be observed. The impression is strong that we have here a modification of B. ricini rather than a combination of characters of the 2 species.

Anastomosis between B. allii and B. ricini.

It has not yet been conclusively demonstrated that complete anastomosis, with fusion of cell contents, occurs in these interspecific co-cultures. Certainly this phenomenon is much less frequent and obvious than in the inter-strain crosses.

In examining slide cultures made with spores of B. allii and B. ricini (Fig. 3, c and d) only those instances were noted when the germ tubes of the pair were so near each other as to be almost in contact. More than a hundred such close associations were scrutinized and among them four cases of apparent anastomosis were observed. It is possible that anastomoses may have occurred more frequently later but after a culture is 48 hours old reliable determinations cannot be made due to the mass of intertwining hyphae. Because of the small number observed we are unable to say whether or not interspecific anastomoses are identical in form and function with intraspecific ones. It is rather our impression that they differ in some degree, appearing to have a constriction where the two hyphae fuse.



Fig. 5 A Cultures of purified new homotype derived from Fig. 4, A, b.

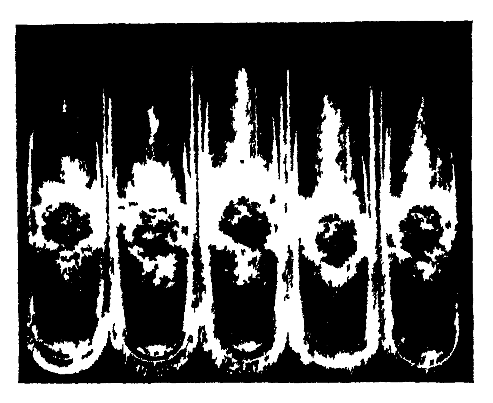


Fig. 5. B. Cultures of purified new homotype derived from Fig. 4, A, c.

Discussion.

The principal fact established by this work is that when a culture tube was inoculated with a mixture of spores and mycelia of two very characteristic, distinct, stable species of Botrytis (B. allii and B. ricini) and single-spore cultures were made from the resultant mixed growth, part of the progeny were identical with either parent, but a considerable proportion (25%) were strikingly different from either and of entirely new types. It is not likely that their appearance was due to spontaneous variation of either of the parents for both of these had been in culture in the laboratory for more than a year and during that time had been transferred by repeated single-spore series many times. In several hundred of such cultures of both parents no variation had been apparent.

By repeated single-spore isolation and selection from some of these aberrant types there have been established strains which remained stable through 5 single-spore culture series of 20 cultures each. These strains are distinct enough to be regarded as new varieties or even new species.

While these results correspond in a general way with those previously obtained from inter-strain crosses, there is one important difference. In the latter case the 2 original parental homotypes continued to re-appear or segregate out in successive generations of single-spore culture series from the variants. No new homotypes were obtained. In the present instance, however, single-spore cultures from the aberrant types have never produced typical B. allii or B. ricini, but it has been possible to obtain stable, new homotypes. This might be taken to indicate the occurrence of genic changes of some sort as a result of the intimate cohabitation of the 2 species, rather than merely a re-assortment of nuclei or heterocaryosis. Since, also, a of the variants resemble, in greater or less degree, B. ricini, and show no similarity whatever to B. allii, la modification of the charalcters of the former is suggested rather than combination of homogenic nuclei of the 2 species in single cells. Whether these effects are expressed through the culture medium, as for example by staling products, or if a more intimate connection as by more or less complete anastomosis is required cannot as yet be decided. The results obtained with inter-strain crosses, however, taken in connection with those of the present work, suggest that some degree and effect of physical union is involved. Whatever the explanation the fact remains that apparently homogenic new forms have been produced by the methods described.



Fig. 6, a. b, c, d. Sporophores of the new types derived from the mixture of B. allii and B. ricini. a from 5 A; b, 5 B; c. 4 A; d, 4 B.

Summary.

Previous evidence is cited of the production of heterogenic types of Botrytis cinerea by mixing together 2 homogenic strains of the fungus in the same culture. Mixing of cell contents by anastomosis, resulting in "heterocaryosis", was suggested as the mechanism of this phenomenon.

New work is described in which an attempt was made to bring about interspecific combinations in imperfect fungi by similar methods. Two of the most stable and well-characterized species of Botrytis (B. allii and B. ricini) were grown together in co-cultures and their progeny analyzed by single-spore methods through many culture series.

Of 20 single-spore isolations from the original mixed culture, 6 were identical with one parent, 9 resembled the other, while 5 were decidedly different from either.

By repeated single-sporing and selection from these aberrant cultures 3 types were segregated which appeared to be sufficiently distinct to be considered new varieties or even new species. These types have remained constant through 5 single-spore culture series. Contemporaneous series of cultures from the original parents showed no variation.

The suggestion is offered that the production of these aberrant homotypes is due to gene changes brought about in some way by interspecific anastomosis.

Bibliography.

I. Brierley, William B., Variation in fungi and bacteria. (Proc. Int. Cong. Plt. Sci. Vol. 2. 1929. p. 1629—1654.) — 2. Davidson, A. M., Dowding, E. S., and Buller, H. H. R., Hyphal fusions in Dermatophytes. (Can. Journ. Res. Vol. 6. 1932. p. 1—20.) — 3. Forstenreichner, F., Die Jugendkrankheit der Baumwolle in der Turkei. (Phytopath. Ztschr. Bd. 3. 1931. S. 367—419.) — 4. Hansen, H. N., and Smith, Ralph E., The mechanism of variation in imperfect fungi. (Phytopath. Vol. 22. 1932. p. 953—964.) — 5. Kohler, E., Zur Kenntnis der vegetativen Anastomosen der Pilze, II. (Planta. Vol. 10. 1930. p. 495—522.) — 6. Matsumoto, Takashi, Yamamoto, Wataro and Hirane, Seiichi, Physiology and parasitology of the fungi generally referred to as Hypocnus Sasakii Shirai. (Journ. Soc. Trop. Agric. Vol. 4. 1932. p. 370—388.)

Nachdruck verboten.

Über Coccidien der Schleiereule.

[Aus der Tropenabteilung des Instituts fur parasitäre und Infektionskrankheiten der Reichsuniversität Utrecht. Direktor Prof. Dr. L. de Blieck.]

Von **Otto Nieschulz.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Februar dieses Jahres erhielten wir von Herrn Dr. ten Kate aus Kampen (Holland) den Kadaver einer im Felde tot aufgefundenen Schleiereule (Tyto alba). Bei der Zerlegung wurden im Duodenum zahlreiche freie Sporocysten einer Coccidienart gefunden, bei denen zunächst keinerlei Andeutungen einer Oocystenmembran zu entdecken war. Erst nach genauem Suchen fanden wir bei noch in Epithelfetzen paarweise zusammenliegenden Sporen Reste einer äußerst feinen Membran (Abb. 1). Da 4 Sporozoiten vorhanden waren, mußte es sich um eine Isospora-Art handeln.

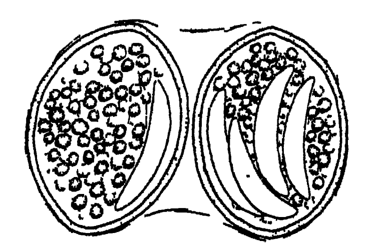


Fig. 1. Isospora buteonis Henry aus einer Schleiereule. Reife Cyste mit zerrissener Cystenmembran. Vergr. 2000×.

Die Cystengröße ließ sich wegen der Schrumpfung der Membran nicht mehr feststellen. Die Sporen waren nach 50 Messungen 12—14, meist $12\frac{1}{2}$ bis 13 μ lang und $9\frac{1}{2}$—12, meist 10—$10\frac{1}{2}$ μ breit. Die Durch-

schnittsmaße betrugen 12,9×10,4 μ. Der Formindex war 0,74—0,92, durchschnittlich 0,81. Die Form der Cysten war oval, beide Pole waren häufig leicht zugespitzt. Die vier wurmförmigen Sporozoiten wiesen keine Besonderheiten in der Struktur auf und besaßen auch keine deutlich hervortretenden Vakuolen. Sie lagen meist der Cystenwand an. Der übrige Teil der Cysten war vom Restkörper eingenommen, der nicht aus einer einheitlichen Masse, sondern aus zahlreichen, ziemlich gleich großen, stark lichtbrechenden Körpern bestand, die durch ihre gleichmäßige Verteilung das Erkennen der Sporozoiten häufig erschwerten.

Diese Isospora-Art ist deutlich von der weit verbreiteten I. lacazii Labbé unterschieden und stimmt weitgehend mit I. buteonis überein, die Henry (1932) bei einer anderen Eulenart, Asio flammeus, aus der Nähe von Washington und bei Buteo borealis, B. swainsoni und Accipiter cooperii aus Californien gefunden hatte. Auch sie weist auf die außerordentliche Zartheit der Cystenmembran und den Ablauf der Sporulation bereits im Wirtstierkörper. Die Maße der Sporen betrugen 9,6—13×8—10,4 μ und waren also kleiner als bei den mir vorliegenden Exemplaren. Trotz dieses Größenunterschiedes möchte ich beide Arten als identisch betrachten. Die Schleiereule wäre demnach ein neues Wirtstier und Europa ein neues Verbreitungsgebiet für Isospora buteonis Henry.

Aus meinem Material ließ sich nicht mehr feststellen, ob I. buteonis für Schleiereulen pathogen ist. Bei der Intensität der Infektion ist dies nicht unmöglich.

Zusammenfassung.

Bei einer Schleiereule (Tyto alba) wurde eine starke Infektion mit einer Isospora-Art gefunden, die als identisch mit I. buteonis Henry betrachtet wird. Die Cystenmembran ist sehr dünn und zerreißt leicht. Die Sporen, die fast stets frei liegen, messen meist 12½—13×10 bis 10½ μ. Der Restkörper ist stark entwickelt und besteht aus freien Körnern. Wirt und Verbreitungsgebiet (bisher nur Nordamerika) sind neu.

Literaturübersicht.

Henry, D. P., Univ. Calif. Publ. Zool. Vol. 37. 1932. p. 291—300.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Zastrow, Elsa, Experimentelle Studien über die Anpassungen von Wasser- und Sumpfmoosen. Pflanzenforschung, herausgeg. von Prof. Dr. Kolkwitz. Heft 17. 70 S. mit 43 Abb. Jena (Verlag Gustav Fischer) 1934. Preis 3.60 RM.

Verf.n hat 30 Moose in Wasserkulturen gezogen und die Einflüsse des Mediums untersucht; daneben wurde in Freilandversuchen die Konkurrenzfähigkeit der einzelnen Arten beobachtet.

Im Gegensatz zu den Wassermoosen zeigten sich bei den Sumpfmoosen z. T. ganz erhebliche Abweichungen in der äußeren Form. Es ergab sich eine starke Streckung der Internodien, wodurch die Blätter weit auseinandergerückt wurden. Die Blattform blieb im wesentlichen erhalten, doch wurden die Blätter in den Wasserkulturen kleiner, auch die Bezahnung des Randes ging zurück. — Gegen Änderungen des ph sind Moose weniger empfindlich als Algen; erst Abweichungen über 0,5 machen sich äußerlich bemerkbar. Bei allen Moosen sind die im sauren Medium aufwachsenden Formen kürzer und großblättriger, als bei alkalischer Reaktion des Wassers; diese Tatsache gestattet auch umgekehrt aus der Wuchsform der Moose einen Rückschluß auf die Beschaffenheit des Wassers zu ziehen.

Die namentlich in den Frühjahrskulturen sehr störende Algenentwicklung ließ sich durch eine 48—60 stündige Behandlung der Moose mit sehr verdünnten Losungen von Oxalsäure oder Bariumchlorid beseitigen.

Verf.n unterscheidet bei den untersuchten Moosen drei physiologische Gruppen: unspezialisierte, mäßig und hochspezialisierte Formen. Die Moose der ersten Gruppe dominieren überall, während die hochspezialisierten schon bei geringen Veränderungen des Mediums zugrunde gehen.

Die Einzelheiten der Untersuchungsergebnisse sind in zahlreichen Tabellen zusammengestellt; die Wuchsformen werden durch klare, anschauliche Zeichnungen erläutert. H. Bethge (Berlin-Dahlem).

Report on the third Imperial Mycological Conference 1934. Imper. Mycol. Inst. Kew 1934. 32 p.

Die dritte dieser alle 5 Jahre stattfindenden Konferenzen wurde in London vom 17.—22. Sept. 1934 abgehalten. Die gefaßten Entschließungen betreffen 1. einheitliche Fassung der Gesundheitszeugnisse des Pflanzenschutzdienstes im Britischen Reich (das vorgeschlagene Zeugnismuster ist abgedruckt), 2. einheitliche Sammlung und Bekanntgabe der im Britischen Reich geltenden Pflanzeneinfuhrbestimmungen, 3. die Möglichkeit der Verschleppung von Pflanzenkrankheiten durch den Luftverkehr und 4. den Ausbau von Methoden für die biologische Normung von Fungiziden und Insektiziden. Beigefügt sind Berichte über die Verhandlungen der Konferenz. Der Direktor des mykologischen Reichsinstituts, Dr. Butler, berichtete über die Tätigkeit des Institutes, insbesondere die Herausgabe der Review of Applied Mycology, und brachte dabei auch einige allgemeine Angaben über Größe und Bedeutung der Schäden durch Pflanzenkrankheiten. Die weiteren Anhänge enthalten noch Auszüge der Verhandlungen der Konferenz zu den gefaßten Entschließungen und von Vorträgen über „Viruskrankheiten der Pflanzen mit besonderer Berücksichtigung der durch Insekten übertragenen, z. B. an Tomate, Tabak und Baumwolle“, „Vereinfachung

von Bekämpfungsmaßnahmen für den Kleinbesitz", „Getreidefußkrankheiten", „Immunitätszüchtung und -auslese", „Wurzelfäulen an Hevea", „Braune Herzfäule von Kohlrüben", „Gummiflußkrankheit des Zuckerrohrs", „Citruskrankheiten" und „Baumwollkrankheiten".

Morstatt (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Zobell, Cl. E., and Feltham, C. B., A comparison of lead, bismuth and iron as detectors of hydrogen sulphide produced by bacteria. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 169—176.)

Für den Nachweis von H_2S bei der Untersuchung von Bakterien-Reinkulturen ist bisher noch keine Methode durch das „Committee of Pure Culture Study of Bacteria" vorgeschlagen, so daß es zweckmäßig erschien, die hierfür angegebenen Methoden einer vergleichenden Untersuchung zu unterwerfen. Vorversuche ergaben, daß nur Salze des Eisens, Bleis und Wismuts hierfür in Betracht kommen, weiterhin ergaben diese Versuche, daß Eisensalze bei Zusatz zum Nährboden eine höhere Empfindlichkeit aufwiesen als die Salze der beiden anderen Elemente. Die Prüfung auf die Einwirkung des Zusatzes von Salzen dieser Elemente zu den Nährböden auf das Wachstum zeigte, daß Bleisalze bereits in sehr geringer Konzentration eine hemmende Wirkung ausüben, während Eisensalze auch in dieser Beziehung sich am günstigsten zeigten, bei Wismutsalzen traten störende Trübungen des Nährbodens auf, die eine genaue Keimzahlbestimmung erschwerten. Bei Pb-Salzen war die hemmende Wirkung bei frisch isolierten Stämmen größer als bei alten Laboratoriumsstämmen, z. T. wirkte schon die geringste als Indikator brauchbare Menge hemmend. Die Methode des Zusatzes von Indikatorsalzen versagt bei dunklen Nährböden und bei solchen Stämmen, die eine Färbung des Nährbodens hervorrufen, hier erwies sich die alte Methode der Anwendung von Bleiazetat-Papier als die beste Methode zum Nachweis der H_2S-Bildung. Diese Methode gestattet noch einen Nachweis von 0,01 Millimol H_2S, während die Empfindlichkeit bei Verwendung von Fe-Zusätzen zum Nährboden nur 0,1 Millimol betrug. Die Verwendung von Bleiazetat-Papier stellt daher nach Ansicht der Verff. zur Zeit die beste Methode zum Nachweis der biologischen H_2S-Bildung dar. Die Tränkung des Indikatorpapiers mit Glyzerin zur Erhöhung der hygroskopischen Eigenschaften hatte gegenüber der Verwendung gewöhnlichen Indikatorpapiers keine Vorteile.

Richter (Kiel).

Thompson, R., A mechanical device which prepares and inoculates rolled tubes. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 279—287.)

Die Verwendung sog. Rollröhrchen an Stelle von Petrischalen hat besonders bei ambulanten Untersuchungen große Vorteile in bezug auf Arbeitserleichterung und Materialersparnis. Als Nachteil dieser Arbeitsmethode mußte bisher angesehen werden, daß gut brauchbare Vorrichtungen zur Anlage von Rollröhrchen, die eine Verwendung der normalen Kulturröhrchen gestatten, nicht vorhanden waren. Der Verf. beschreibt in seinem Artikel eine einfache Vorrichtung zur Anlage von Rollröhrchen mit Hilfe normaler zylindrischer Kulturgläser. Die mit Nährböden beschickten und beimpften Röhrchen werden in eine rotierende Haltevorrich-

tung. die mit elektrischem Antrieb versehen ist, ein ... ant und in senkrechter Lage gerollt. Das Kulturrohrchen rotiert hier ... in einem Wasserbad. das von kaltem Wasser durchflossen wird und so ... schnelle Erstarrung des Nährbodens in dunner Schicht ermoglicht. Die ...altevorrichtung ist durch eine Stopfbuchse geführt, die einen Austritt der Kühlflüssigkeit verhindert. Ri...ter (Kiel).

McClung, L. S., and McCoy, E., Studies on anaerobic bacteria. I. A corn-liver medium for the detection and dilution counts of various anaerobes. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 267—277.)

Fur die Zuchtung von Anaeroben wird ein neuer Nährboden aus Maismehl und getrockneter Leber empfohlen. 1—2% getrocknetes und feinzerriebenes Lebergewebe (Leber aus Leberbouillon bei 55—60° C getrocknet) und 5% Maismehl werden mit Wasser 1 Std. im Dampftopf erhitzt, abgefüllt und 2 Std. bei einem Druck von 15—17 engl. Pfund pro Quadratzoll (1—1,3 Atm.) sterilisiert. Nach der Sterilisation darf der Druck nur langsam gesenkt werden. um ein Heraustreiben des Nährbodens aus den Kulturrohrchen zu verhindern. Der Nährboden ist besonders für solche Anaerobier bestimmt, die Gasbildung (Bombagen) in Konserven hervorrufen. Die Zusammensetzung kann in weiten Grenzen schwanken (Maismehl von 2—8%), ohne daß Unterschiede im Wachstum auftreten, doch ist ein zu geringer Gehalt an Maismehl nicht zu empfehlen, da dann die Viskosität zu weit absinkt. Richter (Kiel).

Stephan, F., Der Wert der Plasma-Agglutinationsreaktion zur Differenzierung der Staphylokokken. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 550—555.)

Von Birch-Hirschfeld ist eine Modifikation der Plasmakoagulasereaktion angegeben worden. die in Form einer Agglutination der Staphylokokken durch Plasma auf dem Objektträger ausgeführt wird. Diese Reaktion hat sich als technisch sehr leicht ausführbar und einfach zu beurteilen erwiesen. Das Ergebnis stimmte fast stets mit dem der Prüfung auf Hämolyse überein, so daß die Reaktion keine prinzipielle Neuaufteilung der Staphylokokken gestattet. Sie stellt aber eine erwünschte Ergänzung der bisher geübten Verfahren dar. Die Ausfuhrung gestaltet sich kurz in folgender Weise: In 1 Tropfen Plasma (Citratplasma von sterilem Menschenoder Tierblut, bei Aufbewahrung im Eisschrank monatelang haltbar) wird mit der Platinöse eine geringe Menge 24stünd. Staphylokokken-Schrägagarkultur langsam verrieben. Bei positiver Reaktion tritt Verklebung und Brockenbildung ein, bei negativem Ausfall lassen sich die Staphylokokken zu einer milchigen Emulsion verreiben. Zur Kontrolle ist Verreiben der Kultur in physiologischer Kochsalzlösung nötig, obgleich Spontanagglutination noch nicht beobachtet worden ist.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Oesterle, P., Ein lösliches Trockenfilter zur Keimzahlbestimmung der Luft. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 137—142.)

Nach unseren derzeitigen Kenntnissen muß ein lösliches Trockenfilter theoretisch und praktisch die beste Keimzahlbestimmung der Luft ermöglichen. Die bisherigen Versuche scheiterten aber an der Notwendigkeit einer

hinreichenden Sterilisation der Filtermasse. Außerdem war die hygroskopische Eigenschaft der in den Versuch gestellten Massen störend. Diese Fehler vermeidet folgende vom Verf. zusammengestellte Mischung:

2 Teile Natr. chlor. pur.
1 Teil Magn. sulf. + 7 H_2O } D. A. B. VI
1 Teil Natr. sulf. + 10 H_2O

Dieses Filtersalz erwies sich in praktischen Versuchen als kaum hygroskopisch, als gut löslich und sterilisierbar. Es ist weder spezifisch fördernd noch schädigend für die einzelnen Keimarten der Luft und kann in kochsalzfreien Nährböden bis zu 2% als indifferent für „Luftkeime" angesprochen werden. Näheres über seine Anwendung und die Methodik der Luftfiltration im Original. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Kausch, E. und Weiß, P., Sojabohnenmehl, ein vollwertiger Ersatz des Nährbodenfleisches. Gleichzeitige Versuche mit Brotnährböden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1934. S. 124—128.)

Nährböden aus Edel-Sojabohnenmehl sind ein vollwertiger Ersatz der üblichen Fleischwassernährböden und, da Pepton wegfällt, fast zu einem Viertel des Preises der Fleischwassernährböden herzustellen. Bereitung des Nährbodens: 120 g Sojamehl werden in 3 l Leitungswasser 2 Tage bei Zimmertemperatur stehen gelassen (täglich 3—4mal kräftig schütteln). Vor dem dann folgenden Erhitzen im Dampftopf (½ Std.) wird der dicke Bodensatz nochmals geschüttelt. Sofort nach dem Erhitzen erfolgt Filtration durch ein dünnes, angefeuchtetes Leinentuch. Das Filtrat wird nun gleich dem Fleischwasser für die Nährbodenherstellung verwendet, und zwar nur unter weiterer Zugabe von 0,4% Kochsalz. — Versuche mit Nährböden aus selbstgemahlenem Mehl aus blauen und gelben Lupinen lieferten gleich günstige Ergebnisse wie die aus Sojabohnenmehl hergestellten. Nährböden aus Lupinen als einheimische Feldfrüchte verdienten dann natürlich den Vorzug, stellen sich außerdem ja noch billiger als Sojabohnen-Nährböden. — Etwa halb so teuer wie Fleischwasser-Nährböden sind Brotnährböden. Sie erwiesen sich besonders als günstige Nährböden für Streptokokken, sind aber etwas umständlich herzustellen. (Näheres hierüber im Original.)
Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Landau, R., Modifications des propriétés biochimiques au cours de la dissociation du Bacterium coli. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 259—262.)

Verschiedene Stämme des Bact. coli wurden durch wiederholte Passage in phenolhaltiger Bouillon einer Dissoziation unterworfen. Nach der Umwandlung verhielten sie sich biochemisch im wesentlichen nicht anders als die Originalkulturen. Geprüft wurde auf Neutralrot-Reduktion, auf Bildung von Säure und Gas aus Laktose und auf Indol- und Schwefelwasserstoffbildung. Bortels (Berlin-Dahlem).

Gibson, T., An investigation of the Bacillus Pasteuri group. II. Special physiology of the organisms. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 313—322.)

Die Untersuchungen sollten in erster Linie zur Klärung der Frage beitragen, ob die Anwesenheit von Harnstoff eine unbedingte Voraussetzung fur das Wachstum von Angehörigen der Gruppe ist. Bei Versuchen, bei denen durch Filtration sterilisierte Harnstofflosung zu Nährboden verschiedener Reaktion gegeben wurde, zeigte sich, daß viele Stämme in Nährlösungen des $p_H = 7,5—7,7$ nicht anwuchsen und auch in stärker alkalischen Nährlosungen nur zögernd zur Entwicklung kamen. Durch eingehende Versuche konnte festgestellt werden, daß fur die schnelle Entwicklung das Vorhandensein von NH_4 notwendig ist. Gutes Wachstum zeigten die meisten Stämme in Nährlösungen mit hohem Pepton- und Fleischextrakt-Gehalt. In synthetischen Nährlösungen mit Glukose oder Salzen organischer Säuren als C-Quellen konnte dagegen niemals Wachstum beobachtet werden. In Mischkulturen vermögen sie sich zu entwickeln, wenn Bouillon oder Proteine anwesend sind. Wie durch Versuche festgestellt werden konnte, findet eine Oxydation des Ammoniaks zu Nitriten nicht statt.

Richter (Kiel).

Ungerer, E., Über die Entstehung des Pigmentes von Azotobacter chroococcum. (Ztschr. f. Pflanzenernähr., Düng. u. Bodenkde. Teil A. Bd. 36. 1934. S. 287—290.)

Es werden kurz die bisher bekannt gewordenen Eigenschaften des schwarzen Pigmentes von Azotobacter chroococcum zusammengestellt und die Bedingungen aufgezählt, unter denen es sich bildet. Ein kleiner Versuch zeigte, daß im Eiweiß von Azotobacter Tyrosin enthalten ist und daß damit die Ansicht von Rippel und Ludwig viel für sich hat, wonach die schwarze Substanz ein Melaninkörper ist, entstanden durch enzymatische Oxydation von Tyrosin. Es ließ sich zeigen, daß während der Bildung des Pigmentes in den Kulturen Ammoniak auftritt und die Reaktion alkalischer wird, Faktoren, die nach den Untersuchungen anderer Autoren die Melaninbildung günstig beeinflussen. Engel (Berlin).

Konokotina, A., Das gegenseitige Verhältnis der Bakterien und der Leguminosen. Die morphologischen Veränderungen der Knöllchenbakterien in Nuta- und Lupinen-Knöllchen. (Mikrobiology. Vol. 3. No. 2. 1934. p. 221—231.) [Russisch.]

Es wurden verschieden fixierte, sowohl ungefärbte wie gefärbte Schnittpräparate der Knöllchen untersucht. Verf. gibt der Beobachtung lebendiger Objekte den Vorzug. Junge Nuta-Knöllchen (Cicer arietinum) sind von weißer Farbe und röten sich mit der Entwicklung der Bakteroiden, so daß nach der verschiedenen Färbung der lebendigen Knöllchen die verschiedenen Entwicklungsstadien der Bakterien bestimmt werden können. In den Schnitten aus der Spitze der Nuta-Knöllchen sieht man Stränge, die die Knöllchenzellen „infizieren“ und Gebilde von unregelmäßiger und eckiger Form, ferner kokkenartige Formen (0,3 μ) enthalten. In den folgenden Schnitten sieht man runde Zellen von 1—2 μ Durchmesser, die sich durch Sprossung vermehren; der Zellinhalt ist anfangs homogen, später körnig. Stäbchenförmige Zellen werden nicht beobachtet. In alten, grünen Teilen des Knöllchens sind die Bakteroiden blasser, färben sich schlecht. Ihre Membrane bersten und der Zellinhalt wird frei. Ferner wird Verlängerung der runden Formen infolge unvollständiger Ablösung der Zellen bei der Sprossung beobachtet. An der Basis des Knöllchens findet man infi-

zierende Stränge von retikulärer Struktur und Zoogloeen, die denen in der Knöllchenspitze gefundenen gleichen. Was die Veränderungen der Nuta-Zellen anbetrifft, so sind die Zellen in der Wachstumszone sehr klein, werden sie infiziert, so beginnen sie zu wachsen und die Vakuolen vereinigen sich in eine zentrale Vakuole. die allmählich zunimmt. Die Bakterien sind in den frühen Stadien in der Umgebung des Kernes gelegen, weiterhin nehmen sie die ganze Zelle ein, werden darauf durch die Vakuole zur Peripherie der Zelle gedrängt und die Bakterien und Plasma enthaltende Schicht wird mit dem Wachstum der Zelle immer dünner. Ein Teil der Knöllchenzellen wird nicht infiziert und diese Zellen nehmen an Umfang nicht zu. Durch Infizierung von Lupinen mit Knöllchenbakterien und folgender Aussaat wurde festgestellt, daß sich bei Lupinen die Knöllchen in den äußeren Schichten der Rinde bilden. und nicht im Perikambium. Die Neubildung setzt sich an den Grenzen des bakteroiden Gebiets fort, es entwickeln sich neue „Metastasen" bakteroiden Gewebes in der Rinde, die sich miteinander vereinigen und die ganze Wurzel umschließen. In den tieferen Schichten des Gewebes sind keine sich teilende Zellen festzustellen. Auf Schnittpräparaten junger Lupinenknöllchen, wie auch bei älteren in der Wachstumszone, ist der Zellkern von bakterieller Masse umgeben, die aus retikulären und kleinen, kokkenartigen Formen besteht. Die letzteren verwandeln sich in allmählich an Umfang zunehmende Stäbchen mit körnigem Inhalt. Die Lupinenbakteroiden sind längliche, abgerundete Stäbchen, die sich im weiteren Verlauf vielfach verzweigen und kleine, retikuläre Formen geben können. Infektionsstränge hat Verf. in Lupinenknöllchen nicht festgestellt und nimmt daher an, daß Zoogloeen sich in alten Teilen der Lupinenknöllchen infolge Eindringens kleiner, durch Veränderung der Bakteroiden entstehender Formen, die in die interzellulären Räume eindringen, bilden. Die Knöllchenbakterien besitzen demnach in den ersten und letzten Stadien ihrer Entwicklung kleine Zellen, die die Infizierung der Knöllchenzellen und die Bildung der Zoogloeen verursachen.

A. Imšenecki (Leningrad).

Korsakowa, M., and **Lopatina, G.,** Das wechselseitige Verhältnis von Bakterien und Leguminosen. I. Stickstoffassimilierung durch die Knöllchenbakterien. (Microbiology. Vol. 3. No. 2. 1934. p. 204—220.) [Russisch.]

Unter Laboratoriumsbedingungen fixieren verschiedene Stämme der Knöllchenbakterien nicht den Luftstickstoff. Sie assimilieren Kohlehydrate in so geringem Maße, daß eine wesentliche Stickstoffzunahme ausgeschlossen ist. Auf dem Felde wurden die Versuche an Lupinen ausgeführt, die mit Nitragin geimpft waren. Die Stickstoffbestimmung bei Lupinen zeigte, daß während der ersten 3 Wochen ihres Wachstums keine Stickstoffassimilation stattfindet. In der Zeit vor der Blütenperiode ist die Intensität des Wachstums der Knöllchenmasse und der Stickstoffassimilation am bedeutendsten. Mikroskopisch werden in dieser Periode außer den Bakteroiden auch Stäbchen an neuen Stellen des Meristems beobachtet. Da vom Standpunkt der physiologischen Funktionen der Zustand des Bakterienplasmas von größerer Bedeutung ist. als die Form der Bakterien, fassen Verff. die Stäbchen und die jungen Bakteroiden zusammen, weil das Plasma bei beiden homogen ist, während sie die alten Bakteroiden mit verändertem Plasmabestand von denselben absondern. An der Stickstoff-Fixierung sind die Stäbchen und die jungen Bakteroiden beteiligt. Was die Assimilation des von den Bak-

terien fixierten Stickstoffes durch die Pflanzen anbetrifft, so sind Verff. der Ansicht, daß die von Schaede vorausgesetzte Verdauung der Bakterioiden wenig wahrscheinlich ist, indem die Stickstoffassimilation in frühen Entwicklungsstadien der Pflanze beginnt. Spezielle Untersuchungen der Form, in welcher der Stickstoff assimiliert wird, ergaben, daß in der Periode, wo die Stickstoff-Fixierung ihren Höhepunkt erreicht, Aminosäuren in den Knöllchen völlig fehlen. In derselben Periode wurden Versuche mit Knöllchenautolyse angestellt, die negativ ausfielen, woraus sich schließen läßt, daß proteolytische Fermente in den Knöllchen nicht vorhanden waren. Die Assimilation der Stickstoffverbindungen vollzieht sich folglich auf Kosten der von den Bakterien produzierten Stoffe und nicht auf Kosten des Bakteroidenzerfalles. A. Imšenecki (Leningrad).

Duggar, J. F., Differences between korean and other annual lespedezas in root nodule formation. (Journ. Americ. Soc. Agronomy. Vol. 26. 1934. p. 917.)

Es wurde hier die bisher wohl allein dastehende Beobachtung gemacht, daß die Knöllchenbakterien verschiedener Arten derselben Leguminosengattung sich nur schlecht gegenseitig vertreten lassen. Wenigstens wurde das aus Feldversuchen geschlossen, bei denen die Knöllchenbildung der Koreanischen Lespedeza (L. stipulacea) auf einem sandigen Lehmboden mit der bei verschiedenen Varietäten von L. striata verglichen wurde. Stets bildeten sich bei den letzten die Knöllchen schneller und zahlreicher. Allerdings ließ sich durch Impfung der Samen mit Lespedeza-Bakterien bei den ersten die Knöllchenbildung erheblich steigern.

Engel (Berlin).

Duggar, J. F., Root nodule formation as affected by planting of shelled or unshelled seeds of bur clovers, black medic, hubam, and crimson and subterranean clovers. (Journ. Americ. Soc. Agronomy. Vol. 26. 1934. p. 919.)

Enthülste und nichtenthülste Samen von Medicago arabica, M. rigidula (bur clovers), M. lupulina (black medic), Melilotus alba annua (hubam), Trifolium incarnatum (crimson clover) und T. subterraneum wurden mit den entsprechenden Knöllchenbakterien geimpft und zur Beobachtung der Knöllchenbildung in einen sauren Sandboden gebracht. Es stellte sich heraus, daß das Entfernen der Hülsen für die Bildung der Knöllchen an den Wurzeln der jungen Pflanzen von Nachteil ist, vor allem bei den Medicago-Arten. Nicht nur die Zahl der Knöllchen je Pflanze war im allgemeinen vermindert, sondern auch die Zahl der knöllchentragenden Pflanzen. Höchstwahrscheinlich beruhte der günstige Einfluß der Fruchtschalen auf ihrer Fähigkeit, vermöge ihrer rauhen Oberfläche das Impfmaterial besser festzuhalten und zu schützen, als die glatte Samenschale das vermag. Engel (Berlin).

Tauson, W. und Schapiro, V., Allgemeine Richtung der Naphthaoxydation durch Bakterien. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 79—87.) [Russisch.]

Die Untersuchungen hatten die Aufgabe, festzustellen, in welcher Menge Naphtha durch Bakterien bei Laboratoriumbedingungen oxydiert wird und ferner die Veränderungen, die die Kohlehydrate des Naphthas dabei erleiden, zu verfolgen. Die Lösung dieser Fragen würde die Beurteilung der quali-

tativen und quantitativen Eigenschaften dieses Prozesses in natürlichen Bedingungen ermöglichen. Die Versuche wurden mit gemischten Kulturen aus Naphthaschächten isolierter Bakterien ausgeführt. Mit diesen Bakterien wurden Kolben, die 500 ccm mineralische Nährlosung und 6,6 bis 15.4 g Naphthaprodukte (Naphtha, Schmieröl) enthielten, infiziert. Fläche der Luftberührung 1.5 qdm, Dicke der Schicht des Naphthaproduktes 0,5 bis 1,1 mm. Im weiteren Verlauf wurden die Refraktionszahl, die Jodzahl und die Verseifungszahl der durch die Bakterien veränderten Naphthaprodukte bestimmt, mittels spezieller Methodik wurde ferner die Menge des unverbrauchten Naphthaproduktes festgestellt. Es erwies sich, daß die Bakterien in 7 Monaten 45,5°₀ Naphtha oxydieren, also ungefähr 250 g/qm. Schmieröle werden in der gleichen Zeit langsamer oxydiert (nur 100 g/qm). Der hohe Prozentsatz der Oxydation beweist, daß die Bakterien fähig sind, die naphthenen und polinaphthenen Kohlenwasserstoffe als einzige Kohlehydratquelle auszunutzen. Der Brechungsindex des Naphthaproduktes steigt mit der Entwicklung der Bakterien, ein Beweis, daß mittlere Fraktionen leichter oxydieren als schwerere. Die Jodzahl sinkt anfangs bei Vermehrung der Bakterien infolge des Verbrauches der Verbindungen der ungesättigten Reihe. Im weiteren Verlauf steigt die Jodzahl, da sich bei der Oxydierung der gesättigten Kohlenwasserstoffe als Zwischenprodukte ungesättigte Kohlenwasserstoffe bilden. Als Oxydationsprodukte entstehen Fett- und Naphthensäuren, infolgedessen steigt die Verseifungsgabe stark. Die Oxydation der Naphthaprodukte verläuft schneller in Gegenwart von Ammoniakstickstoff als in Gegenwart von Nitratstickstoff.

A. Imšenecki (Leningrad).

Krassilnikow, N., Rassenbildung bei Saccharomyces cerevisiae. (Bull. Acad. Sc. de l'URSS. No. 2—3. 1934. p. 335—366.) [Russ.]

Im ersten Teil der Arbeit werden Rassen beschrieben, die sich ohne Anwendung spezieller Faktoren bilden, d. h. infolge sog. spontaner Rassenbildung, die beim Kultivieren der Hefe auf Nährböden bei Laboratoriumsbedingungen eintritt. Bei Aussaat auf Bierwürzeagar entwickelten sich neben den Kolonien der Ausgangsrasse auch neue stabile Rassen. Es wurden auf diese Weise 25 Rassen gewonnen, die nach Form und Größe ihrer Zellen in 5 Gruppen eingeteilt werden können. Zur ersten Gruppe gehört eine Rasse, die nach ihren Merkmalen der Ausgangsrasse sehr nahe steht und sich nur durch größere Stabilität auszeichnet. In 3 Jahren ergab diese Rasse keine einzige Variante. Die zweite Gruppe bilden Rassen mit Kolonien von verschiedenem Aussehen: glatte, körnige, höckerige, die jedoch alle aus langen (10—20 × 5 μ) Sproßverbände bildenden Zellen bestehen. Die dritte Gruppe umfaßt Rassen mit Zwergzellen von 4—5,3 × 2,5—5 μ Umfang. Die Zellen sind oval und bilden kurze Ketten. Die Riesenkolonien können von verschiedener Beschaffenheit sein. Agglomerate bildende Rassen mit kleinen Zellen von 4—6.5 μ bilden die vierte Gruppe. Die Oberfläche der Kolonien ist glatt und körnig, jedoch nicht höckerig. Die fünfte Gruppe zeichnet sich durch Zellen mit langen (bis 10 μ) Ausläufern aus, an deren Spitzen sich kleine Zellen befinden. Bei diesen Rassen kann die Oberfläche der Kolonien in bedeutendem Maße höckerig sein. Die gewonnenen Rassen unterscheiden sich voneinander und von der Ausgangsrasse auch durch andere Merkmale: Geschwindigkeit der Gelatineverflüssigung, Grad der Klärung der Bierwürze, Energie ihrer Vermehrung, ihr Verhältnis zur hohen Temperatur usw. Einige Rassen bildeten Kolonien von brauner Farbe und

zeigten verminderte Widerstandsfähigkeit gegen ungünstige Lebensbedingungen. Werden solche letale Rassen nicht häufig umgeimpft, so gehen sie schnell zugrunde. Spontane Rassenbildung wird häufiger in alten Kulturen von 1½—2 Mon. angetroffen, während sie in jungen Kulturen nicht vorkommt. Bei weiterer Spaltung der entstandenen Rassen können sich aus Formen mit höckeriger Oberfläche der Kolonien glatte bilden und umgekehrt (R ⟷ S).

Im zweiten Teil der Arbeit beschreibt Verf. Entstehung von Rassen unter dem Einfluß supraoptimaler Temperatur. Am stärksten tritt die Spaltung in 10—12 tägigen Kulturen auf Bierwürze-Agar im Thermostat bei 37° ein. Neue Formen bilden sich entweder in Gestalt sekundärer Kolonien auf der Oberfläche der Kultur oder mittels sektoriellen Wachstums. Die gewonnenen Rassen haben viel Ähnlichkeit mit den spontanen und lassen sich in die oben beschriebenen Gruppen einreihen. Es fehlt nur der zweite Zellentypus, der Sproßverbände bildet. Unter dem Einfluß der Temperatur entstehen degenerative Formen mit sehr niedriger Gärungsfähigkeit. Die isolierten „Temperaturrassen" verflüssigen Gelatine viel schneller, als die spontanen, ferner unterscheiden sie sich voneinander in betreff der Intensität ihrer Gärungsfähigkeit und der Energie ihrer Vermehrung.

A. Imšenecki (Leningrad).

Stadnitschenko, N., Über den Einfluß des Kokains auf Hefe. (Bull. Ac. Sc. de l'URSS. No. 5. 1934. p. 669—684.) [Russisch.]

Die Untersuchung der Kokainwirkung auf Schizosaccharomyces octosporus, Zygosaccharomyces mandschuricus, Saccharomycodes Ludwigii, Willia anomala, Pichia mandschurica, Torula pulcherrina und T. glutinis zeigte, daß Kokain für Hefe nur in geringem Maße toxisch ist. Die Zellen von Saccharomyces cerevisiae z. B. gehen in 3proz. wässeriger Kokainlösung nach 60 Std. zugrunde, in 5proz. Lösung nach 8—10 Std. Kokainlösungen in Bierwürze wirken schwächer als wässerige Lösungen. Verschiedene Hefearten besitzen nicht die gleiche Widerstandsfähigkeit gegen Kokain. Unter der Wirkung von 3proz. Kokainlösung wird bei der Hefe die Phase der Erregung, die in der Veränderung der Vakuolenumrisse ihren Ausdruck findet, beobachtet, ferner die Phase der Hemmung mit Vergrößerung der Vakuolen, körnigem Plasma und Anhäufung von Öltröpfchen, endlich erwerben die Zellen das für die dritte, nekrobiotische Phase typische Aussehen — sie verschrumpfen, die Vakuolen verschwinden und das Plasma wird grobkörnig. Auf Mineralnährböden mit Zusatz von 0,1% Kokain kann sich die Hefe vermehren, weil die Zellen das Kokain als Nährquelle ausnutzen. Kleine Kokainmengen von 0,0005—0,1% üben keinen Einfluß auf die Vermehrung der Zellen aus. Bei Dosen von 0,1—0,5% tritt nach der Hemmungsperiode Stimulierung der Vermehrung ein. Dosen von 1% und darüber sind als toxisch anzusehen, da sie die Vermehrung bedeutend hemmen.

Die Gärungsfähigkeit der Hefe wird nur durch toxische Dosen gehemmt (3% und darüber). Unter Kokainwirkung trat Dissoziation der Ausgangsrasse ein und es entstanden sowohl flüchtige Modifikationen wie auch stabile Varianten. Zu den letzteren gehören 9 neue Rassen, die sich durch kulturelle, morphologische und physiologische Merkmale sowohl von der Ausgangsrasse wie auch untereinander unterscheiden.

A. Imšenecki (Leningrad).

Maxia, C., Les levures et les bactéries dans la recherche des radiations mytogénétiques. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934.)

Verf. gibt einen kritischen Überblick über die Methoden zum biologischen Nachweis der Gurwitsch-Strahlen und weist vor allem hin auf die Fehler und Irrtümer bei Verwendung von Hefen und Bakterien als biologische Induktoren und Detektoren. Einwandfreiere Ergebnisse liefern nach Verf. Seeigeleier als Detektoren, sind aber nicht immer zu beschaffen. Deshalb hält man sich bei genaueren Messungen am besten an physikalische und physiko-chemische Apparaturen wie die photoelektrische Zelle und die photographische Platte. Bortels (Berlin-Dahlem).

Kondratjewa, T., Einfluß der Erschütterung auf die Hefe. (Bull. Ac. Sc. de l'URSS. No. 6. 1934. p. 653—668.) [Russisch.]

Die Versuche wurden mit Saccharomyces cerevisiae Rasse XII, Schizosaccharomyces Pombe, Nadsonia fulvescens, Monilia variabilis und Endomyces vernalis ausgeführt. Flaschen mit Zellenmischungen in Bierwürze, ferner Kulturen auf Bierwürze-Agar wurden verschieden lange (von 15 Min. bis 4 Std.) in den Schüttel-Apparat gestellt. Unter dem Einfluß der Erschütterung wird das Plasma der Hefezellen alveolar und körnig, die Menge der Öltröpfchen in den Zellen nimmt zu, die Vakuolen verändern ihre Form. Bei Nadsonia fulvescens nahm die Glykogenmenge ab, zuweilen verschwand das Glykogen vollständig. Die Veränderungen sind um so stärker, je länger die Erschütterung dauert, jedoch stets reversibler Art. Die Erschütterung stimuliert die Kopulation und die Sporenbildung der Hefe, hemmt stark die Vermehrung, sowohl durch Sprossung wie durch Spaltung und übt keinen Einfluß auf die Alkoholgärung aus. Entstehung neuer Rassen, selbst flüchtiger Modifikationen, wurde nicht beobachtet.

A. Imšenecki (Leningrad).

Richards, O. W., The effect of deuterium on the growth of yeast. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 289—294.)

Zu den Versuchen wurde Deuterion-haltiges Wasser von der Dichte 1,000 061 verwendet, das zur Bereitung der Nährlösung nach Williams diente. Als Versuchsobjekt wurde Saccharomyces cerevisiae Hansen benutzt. Die Versuche ergaben, daß Unterschiede in der Keimzahl nicht auftraten, daß aber Unterschiede in dem physiologischen Zustand der Zellen bestehen. Bei der nephelometrischen Untersuchung zeigten die Kulturen mit „schwerem Wasser" vermehrte Streuung, die auf größeres Volumen und unter Umständen auf eine größere Dichte der Zellen zurückzuführen ist. Diese Beobachtung konnte durch die Bestimmung des Zellvolumens und der Trockenmasse bestätigt werden, die beide höhere Werte ergaben als bei der Kontrolle. Das Optimum der Konzentration an „schwerem Wasser" konnte noch nicht bestimmt werden, da hierzu die zur Verfügung stehenden Mengen nicht ausreichten. Richter (Kiel).

Sotnikow, E., Zitronensäurebildung durch den Pilz Aspergillus niger. 1. Zitronensäurebildung in beständigen Lösungen. (Compt. Rend. Acad. Sc. de l'URSS. T. 3. No. 4. 1934. p. 273—378.) [Russisch.]

Zum Nährboden von Kostitschew wurden als Stickstoffquelle hinzugefügt: reduzierter Stickstoff mit verschiedenen Anionen $(NH_4)_2$, SO_4,

$(NH_4)_2$, HPO_4, NH_4Cl, NH_4CNS und NH_4J und oxydierter Stickstoff mit verschiedenen Kationen $NaNO_3$, KNO_3, $LiNO_3$, $Ca(NO_3)_2$, $Mg(NO_3)_2$. Nach 6 Tagen wurde die Zitronensäure bestimmt, wobei es sich erwies, daß oxydierter und reduzierter Stickstoff gleichen Einfluß auf die Säurebildung ausüben. Die entscheidende Rolle spielen die mit der Stickstoffgruppe verbundenen Ionen. Zunahme des Myzelgewichts und maximaler Säuregewinn wird nicht bei Zusatz von NH_4NO_3 oder $NaNO_3$, sondern $Mg(NO_3)_2$ beobachtet, und zwar proportional der hinzugefügten Menge. Bei Zugabe von 0.42 g Mg $(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$ auf 100 ccm Nährboden beträgt der Prozentsatz der Zitronensäure im Verhältnis zum verbrauchten Zucker 30,17%. Mg wirkt nur in Verbindung mit dem Anion der Stickstoffsäure, d. h. Zusatz von $MgCO_3$ hatte keinen Einfluß auf die Ausgiebigkeit der Zitronensäure.

A. Imšenecki (Leningrad).

Sotnikow, E., Zitronensäurebildung durch den Pilz Aspergillus niger. II. Zitronensäurebildung in wechselnden Lösungen. (Compt. Rend. Acad. Sc. de l'URSS. T. 3. No. 4. 1934. p. 279—281.) [Russisch.]

Vorhergehende Kultivierung des Aspergillus-Myzels auf den üblichen Nährböden ist unzweckmäßig, weil sie Zucker in bedeutender Menge erfordert und zudem die Bestimmung der Reifeperiode des Myzels mit Schwierigkeiten verbunden ist. Verf. empfiehlt Kultivierung des Myzels auf folgenden Nährböden: Bierwürze 25%, Wasser 75%, $ZnSO_4$ 0,005% und $FeCl_3$ 0,002%. Die empfohlene Gärlösung enthält 20% Zucker, $Mg(NO_3)_2$ und KNO_3, die letzteren je zu 25 Millimol N^2. Unter diesen Umständen steigt die Zitronensäurebildung 3—12fältig. Bei Zusatz von $Mg(NO_3)_2$ erreicht die Zitronensäure im Vergleich zum verbrauchten Zucker 60,21%. Die Säurebildung steigt stark bei Zusatz von oxydiertem Stickstoff zur Gärlösung, während reduzierter Stickstoff bedeutende Herabsetzung der Zitronensäurebildung hervorruft. Die Wirkung des oxydierten Stickstoffes tritt nur bei der Rasse Asp. niger ein, die zu energischer Säurebildung fähig ist. Rassen, die schwache Fähigkeit zur Säurebildung besitzen, liefern stets wenig Zitronensäure, daher kann Hinzufügung von $Mg(NO_3)_2$ (0,3—0,4%) als Hilfsmittel für die Auslese aktiverer Stämme dienen.

A. Imšenecki (Leningrad).

Sotnikow, E., Zitronensäurebildung durch den Pilz Aspergillus niger. III. Zitronensäurebildung in wiederholt gewechselten Lösungen. (Compt. Rend. Acad. de l'URSS. T. 3. No. 7. 1934. p. 544—547.) [Russisch.]

Die Versuche wurden in Kolben (unter sterilen Bedingungen) und in bedeckten und offenen flachen Küvetten (nicht steril) ausgeführt. In beiden Fällen wurde folgende Gärlösung angewandt: Zucker 20%, $Mg(NO_3)_2 \cdot 6\,H_2O$ 0,32%, KNO_3 0,25%. Alle 4 Tage wurde die Gärlösung durch eine frische ersetzt. Unter nicht sterilen Bedingungen schwankte die Zitronensäuremenge bei 4fachem Wechsel der Gärlösung und 16 Tage langer Gärung zwischen 60 und 70% des verbrauchten Zuckers. In offenen Küvetten war der Zitronensäuregewinn 3—3,5fach geringer als in bedeckten, welcher Umstand durch Verschiedenheit der Durchlüftung, der Wärme- und der Feuchtigkeitsabgabe der Myzeloberfläche zu erklären ist. Unter sterilen Bedingungen schwankt bei wiederholtem Wechsel der Gärlösung der Säuregewinn zwischen 60 und 80%, beim Wechsel der Lösungen sinkt indes die Kurve der Säurebildung allmählich. Höhe der Gärlösung von 0,5 cm ist in Küvetten

günstiger für die Säurebildung als Höhe von 1 cm. Die Methode des wiederholten Wechsels der Gärlösung beschleunigt folglich den Betriebsprozeß und ist daher als die vorteilhafteste für den Zitronensäuregewinn zu empfehlen.

A. Imšenecki (Leningrad).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Virtanen, A. I., On the enzymes of bacteria and bacterial metabolism. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 447—460.)

Verf. berichtet in dem vorliegenden Artikel zusammenfassend über die aus seiner Schule hervorgegangenen Arbeiten über Bakterien-Enzyme und den damit zusammenhängenden Stoffwechsel der Bakterien. Nach einer Besprechung der Ansichten über die Trennung der Enzymkomplexe in „konstitutive" und „adaptive" Enzyme, wobei er die Ansicht vertritt, daß „adaptive" Enzyme nur im Rahmen des für die betr. Bakterienart charakteristischen Enzymapparates gebildet werden, geht er auf die grundsätzlichen Unterschiede in der Art des Vorhandenseins der Enzyme in vegetativen Zellen und Sporen ein (freier Zustand bzw. gebunden an Eiweißkörper). Anschließend behandelt er die Erhöhung der Resistenz der Enzyme in eiweißreichen Lösungen und betont dann, daß der Abbau hochmolekularer Stoffe vor ihrer Verwendung bei der Synthese in allen Fällen auf die Einwirkung der spezifischen Enzyme zurückzuführen ist. Beim Zuckerabbau geht der Weg im allgemeinen über die Stufe der C_3-Körper, eine Ausnahme bildet hier nur die Bernsteinsäurebildung durch Bakterien, bei der eine Aufspaltung in C_2- und C_4-Körper eintritt. Nach Ansicht von Verf. nimmt die Bernsteinsäure eine wichtige Stellung als Zwischenprodukt bei der Bildung der wichtigsten Pflanzensäuren (Malon-, Zitronen- und Akonitsäure) ein.

Richter (Kiel).

Hettche, H. O., Untersuchungen über die Natur der bakteriellen und hämolytischen Bestandteile der Pyocyaneuslipoide. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 83. 1934. S. 499—505.)

Das Lipoid des Bact. pyocyaneum enthält keine unverseifbaren Bestandteile. Es besteht aus einem Neutralfett, einem Phosphatid und freien festen und flüssigen Fettsäuren. Seine bakterizide und hämolytische Wirkung (und damit auch die Wirkung der Pyocyanase) beruht hauptsächlich auf dem Gehalt an flüssigen Fettsäuren. Die Bildung dieser Fettsäuren erklärt sich aus der Lipaseproduktion des Bact. pyocyaneum.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Neuberg, C., and Kobel, M., Present status of the problem of sugar fermentation. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 461—471.)

In der vorliegenden Arbeit geben Verff. einen Überblick über die Entwicklung unserer gegenwärtigen Kenntnis des Zuckerzerfalls bei dem biochemischen, anoxydativen Abbau. Insbesondere wird die Entwicklung der Erkenntnisse über die bei der Gärung durchlaufenen Zwischenstadien dargestellt. Besonders eingehend werden die Rolle und die Art der C_3-Körper behandelt, die als Zwischenstadien des anoxydativen Abbaus in Frage kommen. Einzelheiten müssen im Original eingesehen werden, da der Artikel in kürzester Form eine Übersicht über den augenblicklichen Stand unserer Kenntnisse bietet.

Richter (Kiel).

Arnaudi, C., et Castellani, E., Sur le bacteriophage du „Rhizobium radicicola". (Soc. Intern. Microbiol. Boll. Sez. Ital. Vol. 6. p. 317—321.)

Aus mit Luzerne bestellten Ackerböden haben Verff. den Bakteriophagen für Bact. radicicola isoliert, dessen lytische Fähigkeit spezifisch ist für das Bakterium der Luzerne. Auf dem Nährboden, auf dem die Bakterien am besten wachsen, werden sie auch am schnellsten von dem Bakteriophagen aufgelöst. Sein ph-Optimum wurde mit 6,8—7,4 ermittelt. Erwärmen während 2 Min. auf 95° C vermochte ihn noch nicht unwirksam zu machen. Unter der Einwirkung des Bakteriophagen bildeten die Bakterien keine Bakteroiden, und im Gegensatz zur Behauptung Israilskis wurde durch den Bakteriophagen in Bakterienaufschwemmungen niemals eine Agglutination hervorgerufen. Die einzige morphologische Abweichung zeigten die Zellen, die der Einwirkung des lytischen Prinzips widerstanden hatten. Sie waren bedeutend kürzer und gedrungener und ließen nach Gram-Färbung Granulationen erkennen, die an normalen Zellen niemals beobachtet wurden. Wichtig ist ferner, daß aus den Knöllchen entweder nur der Bakteriophage oder nur die Bakterien isoliert werden konnten, niemals beide zugleich. Verff. vermuten Zusammenhänge zwischen der Bakteriophagie und der Luzernemüdigkeit mancher Böden.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Knorr, M. und Ruf, H., Bakterien und Bakteriophagen im Elektronenfeld. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 92—107.)

Bakterien und Sporen verhielten sich gegenüber Kathodenstrahlen (raschen Elektronen) bei konstanter Spannung und Entfernung gleich empfindlich. Dagegen erwiesen sich die geprüften Bakteriophagen als außerordentlich elektronenresistent. Nur im Kern des Elektronenfeldes kam es zur Vernichtung der Phagen. Im Streukreis des Kernes spielten sich merkwürdige Vorgänge ab, die als Verstärkung der Phagenwirkung angesehen werden. Die hohe Widerstandsfähigkeit des Phagen im Elektronenfeld weist auf seine besondere Struktur hin.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hoder, F., Der Einfluß von Bakteriophagen auf die Phagozytierbarkeit von Bakterien. Experimenteller Beitrag zur therapeutischen Wirkung von Bakteriophagen. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 84. 1934. S. 46—61.)

Durch die Einwirkung von Bakteriophagen gelang es, aus Staphylokokkenkulturen und gramnegativen Darmbakterien sowohl durch gemeinsame Züchtung in Bouillon als auch durch direkten Ausstrich von Bakteriophagen-Bakteriengemischen auf Agar Sekundärkulturen zu gewinnen, die von menschlichen Leukozyten stärker phagozytiert wurden als die normalen Ausgangskulturen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Verona, O., Recherche d'un principe lysant dans les terres cultivées. (Soc. Intern. Microbiol. Boll. Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 427—430.)

Alle Versuche des Verf.s, aus Böden verschiedenster Art Bakteriophagen zu isolieren, die menschenpathogene, pflanzenpathogene oder nichtpathogene Mikroorganismen auflösen, sind negativ verlaufen. Der Bakteriophage tritt

nur dann in nachweisbaren Mengen auf, wenn ihm Gelegenheit gegeben ist, mit dem zugehörigen Bakterium in Berührung zu kommen, wie es z. B. in einem mit Leguminosen bestellten Acker der Fall ist. Es wird angenommen, daß der Boden im allgemeinen nur die Eigenschaft hat, das lytische Prinzip zu übertragen, ohne es in größeren Mengen zu beherbergen.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Lüers, H. und Löther, A., Die viskosimetrische Verfolgung von Enzymreaktionen. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 52. 1935. S. 49—51.)

Für die Verfolgung enzymatischer Reaktionen stellt die Viskosimetrie unter Umständen eine sehr geeignete Meßmethode dar. Bei der Verfolgung der enzymatischen Proteolyse von Gelatine durch Papayotin, ferner durch die Proteasen des Malzes, des Drüsensekretes von Pinguicula und des Filtrationsenzyms Bayer N „Fitragol“ wurde übereinstimmend festgestellt, daß die Abnahme der Viskosität unverhältnismäßig rascher erfolgt als die Zunahme des Amidstickstoffs. Bewährt hat sich bei diesen Untersuchungen das neue Höppler-Viskosimeter mit Universalthermostat.

Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Paulie, E. E., The microflora of Kazakstan sands (Central Asia). (Soil Science. Vol. 38. 1934. p. 401—406.)

Die Untersuchung des bakterienarmen Bodens erfolgte nach der etwas modifizierten, direkten mikroskopischen Methode Winogradskys und erstreckte sich auf die Rhizosphäre folgender Pflanzen: Chondrilla ambigua, Ch. pauciflora und Ch. brevirostris. Bestimmt wurden folgende Bakteriengruppen: Gesamtgehalt an Bakterien, Gehalt an Stäbchen, Kokken, azotobakterähnlichen Formen sowie an dem verbleibenden Rest. Nach der Tiefe zu wies der Gehalt des Bodens an Bakterien zwei Maxima auf: eines dicht unter der Oberfläche in 5—20 cm Tiefe, das andere etwas über dem Grundwasserspiegel in 175—200 cm Tiefe. Meist waren mehr Stäbchen vorhanden als Kokken. Die Größe des Maximums dicht unter der Oberfläche sowie die Entfernung desselben von dieser hingen von der Jahreszeit ab, indem während der Regenzeit der Gehalt an Bakterien größer war und diese sich dichter unter der Oberfläche aufhielten. Außerhalb der Rhizosphäre von Chondrilla wies die Mikroflora keine andere Zusammensetzung auf als innerhalb derselben, so daß die Wurzeln allem Anschein nach ohne Einfluß auf das Bakterienleben der untersuchten Steppenböden waren. Auffallend war das Vorkommen von Azotobakter-ähnlichen Formen noch in Tiefen bis zu 3 m. Ob es sich wirklich um Azotobakter handelte, dafür brachte Verf. außer der Ähnlichkeit in der Form keine anderen Beweise vor.

Engel (Berlin).

Krjutschkowa, A., Zur Untersuchung der ökologischen Variabilität der Mikroorganismen in bezug auf Bodendiagnostik. (Microbiology. Vol. 3. No. 2. 1934. p. 232—258.) [Russisch.]

Im ersten Teil der Arbeit werden die Veränderungen der Mikroflora, die unter dem Einfluß von Düngemitteln stattfinden, erörtert. Als Düngemittel wurde dem Boden „Nitrophoska“ zugesetzt (N 16,5%, P_2O_5 17,5% und K_2O 20%) und zum Vergleich eine Mischung von einzelnen Komponenten,

NH_4NO_3, K_2HPO_4 und KCl, die als NPK bezeichnet wurde. Zur Schätzung der Veränderungen der Mikroflora wurde die modifizierte Methode von Cholodny-Conn angewandt, die darin besteht, daß Objektträger mit Agar-Nährböden verschiedener Zusammensetzung bedeckt werden, wodurch verschiedenen physiologischen Bakteriengruppen Wachstumsmöglichkeit geboten und zugleich die Gewinnung von Reinkulturen erleichtert wird. Das Wachstum auf den Objektträgern ist bei Zusatz von „Nitrophoska" stärker als bei Zusatz von NPK, was daran liegt, daß im ersten Fall alle Nährelemente vereinigt sind. Intensive Entwicklung weisen die Azotobaktergruppen, die Zellulose-zersetzenden Bakterien, vor allem jedoch die Mineralstickstoff verbrauchenden Bakterien auf. Weniger energisch entwickeln sich die Mikroorganismen, die Stickstoff aus komplizierten organischen Verbindungen entnehmen. Werden „Nitrophoska" und NPK als „Streifen" in den Boden eingetragen, so tritt anfangs Wachstumshemmung der Mikroflora ein und nur Aktinomyces vermehrt sich gut. Diese Wirkung ist vom Stickstoff, den die Düngemittel enthalten, abhängig. Am stärksten ist die Bakterienvermehrung in 1 cm Entfernung vom Streifen und diese Wirkungszone des Düngemittels erweitert sich mit der Zeit.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt die Diagnostik des Bodenzustandes in bezug auf die Stickstoffnahrung. Zwei dem Bact. globiformis (Conn) nahestehende Bakterien entwickelten sich im Boden verschieden in Abhängigkeit vom Gehalt des für sie zugänglichen Stickstoffes. Verf. ist jedoch der Ansicht, daß eine Beurteilung des Stickstoffgehaltes des Bodens allein nach der Zahl der Zellen oder Kolonien ungenügend ist und durch Untersuchung der morphologischen Veränderungen eines Indikator-Mikroorganismus zu vervollständigen sei. Bei Impfung einer der obenerwähnten Bakterien auf gleiche Nährböden, jedoch mit verschiedenen Stickstoffverbindungen, erleiden dieselben starke morphologische Veränderungen. Auf Nährböden mit NH_4 z. B. waren die Zellen kugelförmig oder oval, während sie auf Pepton-Nährböden als große, kettenbildende Stäbchen auftraten. Da solche morphologische Veränderungen auch im Boden, bei Zusatz von verschiedenen Stickstoffverbindungen, beobachtet werden, nimmt Verf. an, daß ein solcher Organismus als Indikator auf den Stickstoffbestand des Bodens angewandt werden kann. A. Imšenecki (Leningrad).

Moszynski, A., Répartition quantitative des Enchytraeidae dans différents milieux. (Ann. Mus. Zool. Polonici. T. 9 7. 1930 11. p. 65—127.)

Zur Kleinfauna des Bodens gehören die Enchytraeiden, Würmer, die darin unter sehr verschiedenen ökologischen Bedingungen vorkommen können. Verf. hat die verschiedensten Bodenarten untersucht und darin 26 Arten gefunden. Diese Würmer kommen in verschiedenen Bodenarten in sehr ungleicher Zahl vor. In Thon fehlen sie ganz, in trockenem Sand kommen sie nur vereinzelt vor. Optimale Verhältnisse bietet ihnen ein feuchtes Milieu mit reichlichen, hinreichend verrotteten vegetabilischen Resten; dann können fast 1000 Exemplare je qdm gefunden werden. Ungünstig für sie sind neben großer Trockenheit Beweglichkeit des Substrates (Sand), grobe Bestandteile (Kies) und übermäßige Säure. Jedoch können die E. beim Vorliegen nur eines ungünstigen Faktors oder selbst mehrerer, aber nur schwach ungünstiger sogar reichlich vertreten sein, sofern auch günstige Faktoren mitwirken. Die meisten E. können sich Schwankungen der ökolo-

gischen Verhältnisse weitgehend anpassen. Die Tiefe, die sie erreichen, hängt von den Besonderheiten des Bodens und auch von ihrer eigenen Größe ab. Enchytraeus albidus ist eine überall verbreitete Form, amphibisch und selbst dem direkten Einfluß des Meerwassers angepaßt. Auf die Beziehungen der Arten zueinander und zur übrigen Fauna hat der Verf. seine Untersuchungen nicht erstreckt. K. Friederichs.

Luchetti, G., Sur la méthode de détermination du pouvoir nitrifiant du terrain. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 263—268.)

Im Verlauf von Untersuchungen über die Nitrifikationsfähigkeit verschiedener Böden nach der Methode Barthel, wobei Omelianskische Nährlösung mit Zusatz von Kohlenschlacken verwendet wird, erhielt Verf. keine vergleichbaren Ergebnisse. Z. T. konnte überhaupt keine Bildung von Salpetersäure nachgewiesen werden, obwohl der verwendete Boden nachweislich nitrifizierte. Diese Unstimmigkeiten traten nicht auf, wenn die Schlacken aus der Nährlösung fortgelassen wurden. Als Ursache ist die Adsorption der Ammonsalze und vielleicht auch der Nitrate an die Schlacken anzusehen. Ähnliche negative Ergebnisse erhielt Verf. bei Ersatz der Schlacken durch Holzkohle oder Bimsstein. Bortels (Berlin-Dahlem).

Rigoni, G., Contribution à l'étude de la microflore des hauts lacs alpins. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 63—70.)

Keimzählungen im Wasser eines 2664 m hoch gelegenen Alpensees führten Verf. zur Überzeugung, daß die mikrobiologische Beschaffenheit eines solchen Wassers sich von derjenigen eines Tieflandsees nur in quantitativer Hinsicht unterscheidet. Es wurden in beiden Fällen dieselben Arten von Bakterien und Pilzen gefunden. Auch der Fäkaltypus des Bact. coli sowie dessen spezifischer Bakteriophage ließen sich in der Uferzone des Alpensees nachweisen, wohingegen die Mitte des Sees sehr viel weniger Keime enthielt. Nach der Tiefe zu nahm die Keimzahl ebenfalls ab. Nur der Bodenschlamm enthielt mehr Bakterien und Pilze als das Uferwasser. Verf. schließt, daß hochalpines Seenwasser durchaus nicht immer trinkbar sein muß, und daß es u. U. auch zur Entstehung von Epidemien Anlaß geben kann. Bortels (Berlin-Dahlem).

Rubentschik, L., Roisin, M., and Beljansky, F., Adsorption der Bakterien in Salzgewässern. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 16—34.) [Russisch.]

Nach Schütteln von schwarzem Schlamm mit Bakterienmischung werden 83—99,3% Bakterien adsorbiert (B. prodigiosum, B. mesentericus u. a.). Die Abnahme der Bakterienmenge hängt nur von der Adsorption ab, da Schlamm keine toxische Wirkung besitzt. Die aus dem Schlamm isolierten Bakterien werden stärker adsorbiert und sind schwerer auszuscheiden als die aus dem Wasser isolierten. Am stärksten adsorbiert schwarzer plastischer Schlamm, am schwächsten grauer Sand. Bei größerer Menge des Adsorbenten stieg auch die Menge der adsorbierten Bakterien. Sterilisierung und Oxydierung des schwarzen Schlammes übt keinen Einfluß auf seine Adsorptionsfähigkeit aus, jedoch wird dieselbe durch Bearbeitung des Schlammes mit 10% HCl stark herabgesetzt. Bei andauerndem

Schütteln nimmt die Zahl der adsorbierten Bakterien ab, da feine Schlammteilchen mit Bakterien sich nicht setzen können.

Die Menge der zugesetzten Bakterien und der Prozentsatz der Adsorption stehen zueinander in umgekehrtem Verhältnis. Junge und alte Kulturen nicht sporentragender Formen werden gleichmäßig adsorbiert. Alte Kulturen sporentragender Bakterien werden viel schwächer adsorbiert als junge. Der Prozentsatz der Adsorption ist für lebende Bakterien höher als für tote. Die adsorbierten Bakterien bleiben im Schlamm lange lebensfähig und verändern ihre morphologischen und biochemischen Eigenschaften nicht. Werden 2 Arten, B. mesentericus und B. prodigiosum gleichzeitig adsorbiert, so wird die Adsorption der letzteren durch B. mesentericus gehemmt. Die Bakterienadsorption durch den Schlamm ist von Desorption anderer Bakterien begleitet, d. h. es findet eine wechselseitige Adsorption statt. Die bakteriellen Prozesse im Schlamm verändern unter dem Einfluß der Adsorption ihre Aktivität, die Adsorption von Nitrosomonas z. B. bewirkt bedeutende Abschwächung der Nitrifikation, während die Tätigkeit der sulphatreduzierenden Bakterien stärker hervortritt. Die Aktivität der Hyposulphitoxydierung wird nicht verändert. A. Imšenecki (Leningrad).

Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz im allgemeinen.

Leefmans, S., Ziekten en plagen der cultuurgewassen in Nederlandsch Oost-Indië in 1931. [Krankheiten und Plagen der Kulturgewächse in Niederl. Ost-Indien in 1931.] (Meded. v. h. Inst. v. Plantenz. No. 82. 92 p. Batavia [Landsdrukkerij] 1934.)

Verf. gibt hierin eine Übersicht über die tierischen und pflanzlichen Feinde der Kulturgewächse in den holländischen Kolonien.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Porte, W. S., Notes on the control of transit and storage decays of tomatoes by the use of chemical washes. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1304—1312.)

Durch 3 Min. langes Eintauchen von Tomaten in Lösungen verschiedener Chemikalien bei 47—50° C konnte der Befall derselben mit Lagerfäulen teilweise erheblich herabgesetzt werden. Verwendet wurden Formaldehyd (1 : 300), Kalialaun, Natriumalaun, Ammoniumalaun, Borax, Chlorkalk (je 1%), NaClO (0,25%), Kalomel (0,1%) und Sublimat (0,1%). Auch Mischungen von 2 der genannten Stoffe kamen zur Anwendung. Abspülen der Früchte nach der Behandlung hatte keinen Einfluß. Nur wenn Formaldehyd mit einem anderen Mittel gemischt angewendet wurde, war die Zahl der faulen Früchte größer, wenn nach der Behandlung abgespült wurde. Äthylengas, durch das das Ausfärben der Früchte beschleunigt wird, hatte keinen Einfluß auf das Auftreten von Fäulen.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Kisser, J. und Pertheim, L., Versuche über die Verwendbarkeit von Wasserstoffsuperoxyd als Saatgutbeizmittel. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 409—426.)

Verff. weisen einleitend auf die möglichen nachteiligen Folgen der Beizung mit hochgiftigen Stoffen hin, in erster Linie mit Sublimat. Als Ersatz haben sie 30 proz. Wasserstoffsuperoxyd benutzt, dessen Wirkung sie in verschiedener Verdünnung in Form der Benetzungsbeize an einer größeren Anzahl von Pflanzenarten untersucht haben. Dabei haben sie in

vielen Fällen Totaldesinfektion erzielt. Anderseits gelang es nicht, Spinat mit einer 8 proz. und Futterrüben mit einer 16 proz. Verdünnung der Stammlösung keimfrei zu machen. Buchweizen konnte erst durch Mengen keimfrei gemacht werden, die die Keimung bereits beeinträchtigten. Der Erfolg steht in engstem Zusammenhang mit der Oberflächenbeschaffenheit der Samen. Auch die Widerstandsfähigkeit von Sporen von Tilletia tritici gegenüber Wasserstoffsuperoxyd ist geprüft worden. 20 Min. währende Behandlung mit 10% und mehr H_2O_2 tötete sie ab, 5% reichte nicht aus. Für Weizenkörner, die mit Sporenaufschwemmungen behandelt waren, reichte sogar 1,8% aus. Für die weitere Ausgestaltung der H_2O_2-Beizung werden Richtlinien angegeben, die die Notwendigkeit der Herabsetzung der Oberflächenspannung und der Erhöhung der keimtötenden Wirkung betonen.
Braun (Berlin-Dahlem).

Passalacqua, T., Expériances de vaccination sur le „Pelargonium zonale". (Soc. Intern. Microbiol. Boll. Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 83—87.)

Es handelt sich um den Versuch, abgeschnittene Triebe von Pelargonium zonale gegen ein Bakterium zu immunisieren, das auf den Blättern der Pflanze eine gewisse Panachure hervorrufen soll. Die Vaccine bestand aus erhitzten oder durch Formol abgetöteten Kulturen. Dadurch, daß die frisch geschnittenen Triebe die stark verdünnte Vaccine aufsaugten, erhielten sie in einigen Fällen, jedoch nicht in allen, eine gewisse Immunität. Die Gründe für den wechselnden Erfolg der Vaccination sind nicht bekannt.
Bortels (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Petersen, H. E., Studies on a parasitic fungus in the Eelgrass, Zostera marina L. (Bot. Tidskr. Bd. 43. 1934. p. 1—9.)

Im Jahre 1930 wurde eine Krankheit an Zostera marina entdeckt, die sich in den folgenden Jahren rasch bis zu den europäischen Küsten ausbreitete. Bestimmend war für das Auftreten dieses Parasiten der Kochsalzgehalt des Meerwassers, in Gewässern mit weniger als 1% ist er offenbar nicht mehr lebensfähig, er verträgt 6% noch ganz gut. In den Wurzeln von Zostera findet man das Myzel fast das ganze Jahr über. Von einem auf der Epidermis braun erscheinenden Fleck nimmt es seinen Ausgang. Es wächst teils intra-, teils interzellulär, ist septiert und reich verzweigt. Im Winter wird mit der Bildung von Perithezien begonnen, die bei der sommerlichen Reife $^1/_5$—$^1/_4$ mm breit sind und dicht unter der Epidermis liegen. Dann durchbricht das Ostiolum die Epidermis, um die 250 μ langen, spitzen und 2—3 μ breiten Askosporen zu entleeren. In den meisten Fällen erfolgt eine Infektion am basalen Teil der Blätter und zwar durch Askosporen, da Konidien bislang nicht aufgefunden wurden. Es gelang Verf. auch, den Pilz mit reichem Myzelwachstum zu züchten und künstliche Infektion hervorzurufen. Der in Frage kommende Parasit besitzt Ähnlichkeit mit Ophiobolus maritimus Sacc. (syn. Raphidophora maritima Sacc.). Verf. läßt die Frage offen, ob es sich um einen Neuling in den dänischen Gewässern handelt, oder ob der schon längere Zeit hier lebende Pilz aus irgendeinem Grunde plötzlich virulent geworden ist.
Skallau (Berlin).

Goossens, J., Onderzoek naar de eerste infectiebron van appel- en pereschurft. [Nachforschung nach der ersten Ansteckungsquelle von Apfel- und Birnenschorf.] (Tijdschr. over Plantenz. H. 8. 1934. S. 174—176.)

Bis jetzt glaubte man immer, die Askosporen der Schorfpilze bilden die erste Ansteckungsquelle für die eben entfalteten Blättchen und jungen Früchte und richtete infolgedessen die Zeit der ersten Bespritzungen nach dem Austreten dieser Sporen aus den reifen Perithezien. Zweifel an dieser Tatsache haben Verf. dazu geführt, diese Meinung auf ihre Richtigkeit zu prüfen, wobei sich herausstellte, daß nicht die Askosporen, sondern die in Kurztrieben und einjährigen Zweigen überwinterten Konidien die erste Ansteckung verursachen, welche also schon beim Aufgehen der Knospen stattfindet. Zu diesem Ergebnis kamen zu gleicher Zeit zwei Engländer, Dillon Weston und Petherbridge. Frühzeitige und mehrmalige Bespritzung erzielte günstige Resultate.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Banga, O., Het steelrot van appels. [Stielfäule bei Äpfeln.] (Tijdschr. over Plantenz. H. 7. 1934. S. 157—167.)

Im Winter 1932/33 trat bei Äpfeln in verschiedenen Lagerräumen in der Betuwe eine bisher unbekannte Stielfäule auf. Als Ursache wurde neben einer Cylindrocarpon-Art ein nicht näher bestimmter Pilz aus der Gattung Phomopsis gefunden. Aus den Beobachtungen geht hervor, daß die Pilze die vorher eingetrockneten Stiele durchwachsen und von hier aus in das Innere der Frucht vordringen. Die unverletzte Schale vermögen die Pilze nicht zu durchdringen. Angenommen wird, daß vorzeitiges Pflücken der Äpfel das Eintrocknen der Stiele und somit das Eindringen der Pilze in denselben begünstigt. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Verral, A. F., The resistance of saplings and certain seedlings of Pinus palustris to septoria acicola. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1262—1264.)

Verf. führt die Resistenz von jungen Kiefern und Kiefernsämlingen darauf zurück, daß bei ihnen die Harzbildung größer als bei anderen ist. Die Wirkung des Harzes könnte eine Giftwirkung sein, wahrscheinlicher aber ist, daß es die Feuchtigkeitsverhältnisse ändert oder einen mechanischen Schutz darstellt. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Verhoeven, W. B. L., Invloed van Zeeuwsche Blauwen op Eerstelingen. [Einfluß von Zeeuwsche Blauwen auf Eerstelingen.] (Tijdschr. over Plantenz. H. 8. 1934. S. 173—174.)

Die Kartoffeln der Sorte Zeeuwsche Blauwen tragen ein Virus mit sich, welches die Strichelkrankheit bei anderen, dafür empfindlichen Sorten hervorrufen kann, so z. B. bei Eersteling, wie Verf. durch Versuche nachgewiesen hat. Die Landwirte sollten, mehr als jetzt geschieht, bei Aufstellung ihres Bestellplanes dieser Tatsache Rechnung tragen.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Jagger, I. C., and Chandler, N., Big vein, a disease of lettuce. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1253—1256, 1 fig.)

Verff. beschreiben eine Krankheit des Salates, die als „dicke Blattrippe" bezeichnet wird, und die, soweit bisher bekannt ist, nur in Kalifor-

nien und Arizona vorkommt. Die Krankheit tritt besonders auf schwerem, wenig durchlässigem Boden auf. Die Ansteckung erfolgt vom Boden aus. Durch Mangansulfat, Zinksulfat, Borsäure, Eisensulfat, Kupfersulfat, verschiedene Kunstdünger und durch Gründüngung wurde die Krankheit nicht eingedämmt. Sterilisieren mit Dampf oder Formaldehyd verhinderte das Auftreten der Krankheit. Verff. vermuten, daß es sich um eine Viruskrankheit handelt. Resistente Sorten wurden bis jetzt nicht gefunden.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Weindling, R., Studies on the lethal principle effective in the parasitic action of Trichoderma lignorum on Rhizoctonia solani and other soil fungi. (Phytopathology. Vol. 24. 1934. p. 1153—1179, 6 figs.)

In früheren Untersuchungen hat Verf. bereits festgestellt, daß Trichoderma lignorum auf Rhizoctonia solani und anderen Bodenpilzen parasitiert. Verf. konnte nunmehr ermitteln, daß das „tödliche Agens" von jungen Hyphen von Trichoderma in das umgebende Medium abgeschieden wird. Es ist zweifellos eine chemische Substanz, aber weder ein Enzym noch das Produkt einer Autolyse. Unter aeroben Bedingungen wird die Zersetzung mit steigendem ph beschleunigt. Bei 2° C geht sie langsamer als bei Zimmertemperatur vor sich. Unter aeroben Bedingungen ist die Zersetzung ziemlich unabhängig vom ph des Mediums, sie geht außerdem nicht vollständig zu Ende. Kochen eines Filtrates von dem „tödlichen Agens" schwächt die Wirkung stark, während längeres Erhitzen im Autoklaven die Wirkung nicht vollkommen zerstört. Wenn ein adsorbierendes Mittel wie Tierkohle mit Trichodermasporen ausgesät wurde, war das Filtrat von der Kultur wenig wirksam. Der Vergleich der Wachstumskurven zeigt, daß alkalische Reaktion für Rhizoctonia günstig, für Trichoderma ungünstig ist. Das durch Rhizoctonia solani verursachte Umfallen von Citrussämlingen konnte durch Zufügen von Trichodermasporen zu einem genügend sauren sterilisierten Boden bekämpft werden. Trichoderma Koningi und T. album und alle Isolationen von T. lignorum griffen Rhizoctonia an. T. lignorum parasitierte auf Rhizoctonia bataticola und Armillaria mellea.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Dippenaar, B. J., Environmental and control studies of the common scab disease of potatoes caused by Actinomyces scabies (Thaxt.) Guss. Dissert. Stellenbosch, Südafrikanische Union, 1933.

In Laboratoriums-, Gewächshaus- und Freiland-Versuchen wurde der Einfluß der Temperatur, der Feuchtigkeit und der Reaktion des Bodens auf die Entwicklung des Schorferregers und den Umfang des Befalls der Kartoffeln ermittelt. Zwischen 13 und 25° C trat die Krankheit bei allen Temperaturen in gleicher Stärke auf. Das Optimum dürfte bei etwa 20° C liegen. Oberhalb und unterhalb dieser Grenze war die Stärke des Befalls deutlich verringert. Die Bodenfeuchtigkeit übte ihren größten Einfluß aus während der ersten 4 Wochen nach dem Knollenansatz, bevor diese einen Durchmesser von 2 cm erreichten. Durch Erhöhung des Wassergehalts wurde die Befallsstärke stark herabgesetzt und die Ernte erhöht, während umgekehrt verhältnismäßig gesunde Knollen schorfig wurden, wenn der Boden trockener wurde. Dieses Verhalten des Actinomyces scabies, der sich in sehr feuchten Böden kaum vermehrt, soll nach Verf.

mit der Lüftung des Bodens nicht im Zusammenhang stehen. Was den Einfluß der Bodenreaktion betrifft, so war der Befall bei ph 5,3 und darunter nur noch so gering, daß er vernachlässigt werden konnte. Bei ph-Werten unter 4.78 wurden aber auch die Kartoffelpflanzen selbst geschädigt. Am besten entwickelte sich der Schorferreger im ph-Bereich oberhalb ph 5,9. Mit Schwefelblume allein oder zusammen mit Gründüngung ließ sich der Kartoffelschorf während der 3 Versuchsjahre nicht bekämpfen. Auch mit Ammoniumsulfat sowie mit Aluminiumsulfat wurde dieses Ziel nicht erreicht. Schorfiges Pflanzgut konnte durch Behandlung mit Sublimat oder Sublimat-Salzsäure oder mit kaltem Formaldehyd von dem Erreger befreit werden.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Tierische Schädlinge.

Schwartz, M., Auftreten und Bekämpfung des Kartoffelkäfers in Stade. (Nachrichtenblatt f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 14. 1934. S. 73—75.)

Verf. berichtet über die Maßnahmen, die zur Bekämpfung des 1934 in Stade aufgetretenen Kartoffelkäfers getroffen worden sind. Die Befallsherde wurden mit Gräben von 40 cm Tiefe und 30 cm Breite umgeben, deren Sohle und steile Ränder mit Rohbenzol getränkt wurden. Die Kartoffelpflanzen wurden dann einzeln abgesucht, die gefundenen Larven, Käfer und Eigelege gesammelt und abgetötet, die Pflanzen selbst in Erdgruben von 2—3 m Tiefe gebracht und mit Benzol überbraust. Schließlich wurde der geräumte Acker ebenfalls mit Rohbenzol (4—5 l je qm) übergossen. Etwa 300 Käfer und 8000 Larven sowie 10 Eigelege wurden gesammelt. Bei einigen in der Nähe festgestellten Spritzinfektionen konnten noch einzelne weitere Tiere gefunden werden. Sämtliche im Umkreis von 5 km gelegenen Kartoffelfelder wurden sodann mit Bleiarsenatbrühe von 0,4% mehrmals gespritzt. Die bisherigen Kosten der durchgeführten Maßnahmen betragen etwa 60 000 RM. Hiervon entfallen rund 33 000 RM. auf die zur unmittelbaren Bekämpfung erforderlichen 100 000 l Rohbenzol. Die Kosten für die Entschädigung der Besitzer der vernichteten Felder sind in der genannten Summe noch nicht einbegriffen.

Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Stöhr, Erfahrungen mit der roten Spinne (Kupferbrand) im Anbaugebiet Tettnang. (Allgem. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 74. 1934. S. 700—701.)

Der Tettnanger Hopfenbau ist im Jahre 1934 infolge der heißen und trockenen Frühsommerwitterung vom Kupferbrand besonders stark heimgesucht worden. Zur Bekämpfung angewandt wurden 2 proz. Spritzbrühen von Schwefelkalk, 1 proz. Erysit, Nikotin und Petrol-Schmierseifenbrühen. Die Erfahrung lehrte, daß nicht das Spritzmittel allein, sondern vor allem intensives Spritzen (Waschen), Benetzen der Blätter von der Unterseite her, erfolgversprechend ist. Die Hochsommergeneration der Spinne war viel beweglicher und vermehrungsfähiger als die Vorsommergeneration. Tränken der trockenen Hopfengärten mit Wasser oder leichter Gülle machte die Pflanzen widerstandsfähiger. Tettnanger und Schwetzinger Frühhopfen, ebenso Stadtspalter, ferner der eigentliche Späthopfen (Rottenburger) erlagen den Angriffen der Spinne rasch und in großem Umfang, oftmals fielen alle Blätter von unten aus ab und es blieb nur oben am Längsdraht eine Haube, die aber auch nichts Rechtes an Dolden hervorbrachte. Auffallend

widerstandsfähig erwies sich dagegen der Striesselspalter Hopfen, diese Eigenschaft kann vielleicht bei Neuzüchtungen verwendet werden. Um das Wiederauftreten der Spinne im nächsten Jahr zu erschweren, sind alle Reste zu verbrennen, die Hopfenstangen mit Karbolineum oder Schwefelkalkbrühe zu entseuchen und der Boden durch Düngung mit staubfeinem Ätzkalk zu desinfizieren. Heuß (Berlin).

Bartley, H. N., and Scott, L. B., Preliminary report upon the infestation and general status of the european corn borer in western New York. (United States Department of Agriculture, Washington, D. C. Circular No. 197, December 1931.)

Die Arbeit gibt einen Überblick über die Befallsverhältnisse durch den Maiszünsler (Pyrausta nubilalis Hübn.) in den Vereinigten Staaten vom ersten Auffinden im Jahre 1919 bis zum Jahre 1931. Es folgen Angaben über die Untersuchungsmethoden in der Maispflanze, in der Stoppel und in Ähren. Verf. gibt ferner eine Übersicht über die Befallsstärke im Verlauf der einzelnen Jahre, über die Pflanzverhältnisse, die Prozentsätze des Absterbens der einzelnen Stadien des Maiszünslers im Verlauf der Entwicklung und die Wirtspflanzen. Angaben über wirksame Bekämpfungsmaßnahmen werden nicht gegeben. Kunike (Berlin-Dahlem).

Essig, E. O., and Michelbacher, A. E., The Alfalfa Weevil. (Calif. Coll. Agr., Agr. Exper. Stat., Berkeley. Bull. 567. 1933 12. 99 p., 16 fig.)

Phytomonas variabilis, der Luzerneblattnager, in Nordamerika eingeschleppt und daselbst Alfalfa Weevil (Luzernerüßler) genannt, galt in Kalifornien vor 1932 als auf die nordöstlichen Teile des Staates beschränkt, und man sah die hohe Sierra Nevada als hinreichendes Hindernis weiterer Ausbreitung an. In 1932 jedoch wurde der Käfer in Mittelkalifornien entdeckt. Das Bulletin stellt seine Naturgeschichte, seine Nahrungspflanzen, seine Feinde und die Bekämpfungsmaßnahmen dar. Umfassendes Literaturverzeichnis. K. Friederichs.

Kemp, H. I., Studies of solid stem wheat in varieties in relation to wheat stem sawfly control. (Scientific Agriculture. Vol. 15. 1934. p. 30—38.)

Verf. hat beobachtet, daß Weizensorten mit gefülltem Halm wie Golden Ball oder mit halbgefülltem Halm wie White Straw Tuscan durch die im westlichen Kanada starke Schäden verursachende Cephus pygmaeus nicht so stark befallen werden. Daraufhin durchgeführte Infektionsversuche haben die Richtigkeit dieser Beobachtung bestätigt. In den befallenen Pflanzen vermochte der Schädling nicht zu überwintern. Freilandprüfungen mit 38 Sorten mit gefülltem Stengel ergab bei 250 Pflanzen zwar einen Befall, der sich zwischen 0,4 und 39,2% bewegte, die Knoten waren aber bei vielen Sorten überhaupt nicht durchbohrt und bei den übrigen nur bei 0,4 bis 6,8% der Pflanzen. Für die praktische Bekämpfung werden in erster Linie Vulgare-Weizen mit gefülltem Stengel und guter Mehl- und Backqualität zum Anbau empfohlen. Braun (Berlin-Dahlem).

Nelson, R. M., Effect of bluestain on southern pines attacked by bark beetles. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 327—354.)

Dentroctonus frontalis Zimm. ruft schwere Verluste in den Kiefernwäldern der südlichen Vereinigten Staaten hervor. Die befallenen Bäume erkranken meist auch an Blaustreifigkeit. Verf. hat festzustellen gesucht, wieweit Beziehungen zwischen diesen beiden Erscheinungen bestehen. Er hat seine Untersuchungen an Pinus echinata, P. rigida und P. virginiana durchgeführt. Verf. kommt zu dem Ergebnis, daß die Erreger der Blaustreifigkeit nur durch die Eingangspforten oder die Lüftungskanäle in das Holz gelangen können, die von den Käfern angelegt werden. Er hat aus den erkrankten Geweben sowohl wie aus den Käfern Ceratostomella pini und C. ips isoliert und Infektionsversuche mit diesen beiden Pilzen durchgeführt, um die Bedingungen für die Infektion und für die Ausbreitung der Pilze im Baum näher kennenzulernen. Der Wassergehalt nimmt bei gesunden Bäumen von der Basis nach der Spitze, bei kranken umgekehrt zu; er ist in kranken Geweben niedriger als in gesunden. Es konnte weiter gezeigt werden, daß Farblösungen durch die verfärbten Flächen hindurch nicht aufstiegen, woraus geschlossen wird, daß ein erkrankter Baum kein Wasser durch die erkrankten Gewebe hindurch zu befördern vermag. Bäume, die an einer Stelle durch und durch blaustreifig sind, gehen deshalb an Wassermangel zugrunde. Verf. glaubt, daß C. pini für D. frontalis notwendig ist, um die Herabsetzung des Wassergehaltes herbeizuführen, die für die Entwicklung der Käferbrut unerläßlich ist. Braun (Berlin-Dahlem).

Voukassovitch, H., et P., Variations dans la durée du développement du papillon Ephestia kuehniella Zeller. (C. R. Séances Soc. Biologie. T. 117 28. 1934. p. 33—36.)

Mehlmottenraupen aus dem gleichen Gelege und mit gleicher Nahrung aufgezogen, hatten eine sehr verschiedene Entwicklungsdauer. Verf. nennt diese Veränderlichkeit der Entwicklungsdauer „individuell" und schreibt sie inneren Ursachen zu. Die Versuchstiere wurden bei den 2 Hauptversuchen isoliert aufgezogen. In diesen Fällen entwickelte sich die große Mehrzahl der Raupen (77—92%) in 45—59 Tagen bzw. in 72—84 Tagen, wobei der Unterschied der beiden Zuchten auf verschiedener Ernährung beruhte. Der viel kleinere Rest bildete eine zweite Gruppe, bei der die Entwicklung nicht nur viel länger dauerte, sondern auch viel stärker in der Dauer variierte: 68—136 Tage und 91—192 Tage. Graduelle Übergänge zwischen den beiden Gruppen gab es nicht.

Vorzeitige Entwicklung kam ebenfalls vor, aber viel seltener; sie war am häufigsten und hatte die stärkste Amplitude bei nährstoffarmem Futter. Äußere Faktoren beeinflussen also die Amplitude der Abweichungen. Die individuelle Variation erwies sich um so häufiger und größer, je ärmer die Nahrung war. Reis war das ungünstigste Futter; in solchem war die vorzeitige Entwicklungsdauer kürzer als die mittlere bei reichster Nahrung (Mais), die verzögerte aber verlängerte sich bis auf 179, 306 und selbst 367 Tage. Arme Nahrung bewirkte hohe Sterblichkeit; bei reicher Nahrung waren die Ergebnisse in bezug auf den Einfluß derselben auf Häufigkeit und Amplitude der Variationen widerspruchsvoll. — Dichte Besetzung der Gefäße wirkte verzögernd. Die Veränderlichkeit der Entwicklungsdauer ist von Vorteil für die Art, weil die Falter zu verschiedenen Zeiten erscheinen.

K. Friederichs.

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Maercks, H., Untersuchungen zur Ökologie des Kohlweißlings (Pieris brassicae L.). I. Die Temperaturreaktion und das Feuchtigkeitsoptimum. (Ztschr. Morph. Ökol. Tiere. Bd. 28 5. 1934. S. 692—721.)

Der Kohlweißling kann sich innerhalb sehr weiter Temperaturgrenzen entwickeln. Im Feuchtigkeitsoptimum (85% r. L.) entwickelten sich bei 8° C noch 40% der Raupen zur Puppe und bei 31° 32% zum Falter. Die untere Grenze liegt bei 7°, die obere bei etwa 36°. Das Optimum ist 23°. Die Entwicklungsdauer folgt in Abhängigkeit von der T. einer asymmetrischen Kettenlinie, so auch die Schlüpfzeit der Falter. Alle präimaginalen Stadien haben das gleiche T.-Optimum. Die kürzeste Entwicklungszeit haben alle Stadien bei 29°. Die T.-Reaktion der 2. Generation unterscheidet sich grundsätzlich nicht von der der 1. Aber die Wetterverhältnisse der Jahreszeit bewirken eine konstitutionelle Schwächung der 2. Generation. Das Überliegen der Puppe ist eine Funktion nichtoptimaler Umweltfaktoren oder innerer Schadfaktoren. Es wird eine Definition der Begriffe Temperaturoptimum, Feuchtigkeitsoptimum und absolutes Optimum gegeben.

K. Friederichs.

Mason, A. C., Some methods for stipping, feeding, and rearing Fruit-fly parasites. (Journ. econom. Entom. Vol. 27 5. 1934 10. p. 891—897.)

Mit der Einführung von 4 Arten von Parasiten der Fruchtfliege Ceratitis capitata in Hawaii hat man in 10 Jahren erreicht, daß seit 1917 durchschnittlich gegen 50% der Schädlinge parasitiert sind. Obgleich man mit anderen Parasiten in Hawaii viel mehr erreicht hat, finden die der Fruchtfliege viel Interesse, und es werden daher die Methoden der Überführung in andere Länder und der Zucht dargestellt. Da parasitierte und nicht parasitierte Fliegenpuparien nicht mit Sicherheit zu unterscheiden sind, so ist Transport solcher durch fruchtfliegenfreie Länder gefährlich. Man versendet deshalb erwachsene Parasiten (Schlupfwespen), wobei der Prozentsatz lebend ankommender am größten ist bei einer mit Fütterung abwechselnden Kühlhaltung. Die Parasiten sind langlebig. Als Futter bewährte sich Honiglösung 1 : 2. Zur Zucht müssen kleine Käfige verwendet werden, so daß die Parasiten in enger Berührung mit den infizierten Früchten sind. K. Friederichs.

Sassuchin, D. N., Hyperparasitism in Protozoa. (Quarterly Review of Biol. Vol. 9 2. 1934 6. p. 215—224, 2 fig.)

Eine Übersicht der vom Verf. und anderen in Protozoen angetroffenen Parasiten. Solche können sein: Bakterien, Pilze (von denen mehrere genauer behandelt werden), Protozoen (z. B. Microsporidien in Gregarinen) und sogar ein Fadenwurm (in dem Ciliaten Pycnothrix monocystoides). Die Anwesenheit von Parasiten, sagt Verf., kann den Untersucher der Protozoen irreführen, indem sie nicht als solche erkannt werden. Da sie Feinde infektiöser Protozoen sind, verdienen sie ernste Aufmerksamkeit.

K. Friederichs.

Abgeschlossen am 28. Mai 1935.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 92. No. 13/19
Ausgegeben am 17. Juli 1935.

Nachdruck verboten.

Bacterium acidi lactici Hueppe und seine systematische Stellung auf Grund seiner Eigenschaften.

[Aus dem Chem. Untersuchungsamt Reichenbach, Eulengebirge[1]).]

Von G. Prange.

Dem bei der Milchsäuregärung gefundenen Bact. acidi lactici wurde bereits von seinem Entdecker Hueppe (20) auf Grund der damals festgestellten Eigenschaften (Unbeweglichkeit, Indolbildung, schleimiges Wachstum) ein Platz zwischen dem Bact. coli und dem Bact. lactis aerogenes zugewiesen. Eine Reihe von Forschern, wie Kruse (26), Wilde (50), Lehmann und Neumann (29), Conradi und Bierast (11), haben Bact. acidi lactici in die Lactis aerogenes-Gruppe eingereiht, andere, z. B. Escherich (13), Mac Conkey (10), Gruber (18), Burri und Mitarbeiter (7, 8), Kligler (22), sind für die Aufrechterhaltung einer selbständigen Acidi lactici-Gruppe eingetreten. Mac Conkey, Gruber und Kligler bemühten sich, mit Hilfe des verschiedenen Gärvermögens gegenüber Kohlehydraten und Alkoholen eine Trennung aller Gruppen zu ermöglichen. Von Mac Conkey wurden die Stämme als Bact. acidi lactici angesprochen, die Laktose, nicht aber Dulcit und Saccharose zu zerlegen vermochten. Kligler hat seiner Einteilung außer diesen beiden Substanzen das Salizin zugrunde gelegt. Burri und Düggeli (8), welche die Gasbildung und -zusammensetzung der Coli aerogenes-Gruppe untersuchten, entdeckten bereits eine weitgehende Übereinstimmung von Bact. acidi lactici und Bact. coli. Auch Kozai (25) hat nur sehr geringe kulturelle und keinerlei physiologische Unterschiede zwischen diesen beiden Bakterien auffinden können.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen jüngerer Forscher, Hees und Tropp (19), Maulhard (32), die ein grundverschiedenes Verhalten von Bact. acidi lactici und Bact. lactis aerogenes gegenüber Saccharose, Inosit und substituierten Kohlehydraten, insbesondere Schwefelzuckern, festgestellt haben, findet man in der Literatur, vor allem in zahlreichen Hand- und Lehrbüchern, noch immer den irrigen Standpunkt vertreten, daß konstante Unterscheidungsmerkmale für Bact. lactis aerogenes und Bact. acidi lactici nicht vorhanden seien, und daß es daher zweifelhaft sei, ob letzteres nur der Lactis aerogenes-Gruppe einzuordnen oder mit Bact. lactis aerogenes selbst zu identifizieren sei. Über die Verschiedenartigkeit dieser beiden Bakterien kann kein Zweifel mehr bestehen. Wenn die Stellung des Bact. acidi lactici noch nicht genügend geklärt zu sein scheint, dann nur hinsichtlich seines Verhaltens gegenüber der vielgestaltigen Gruppe des Bact. coli.

Bei seinem Vorhaben, die Coli-Gruppe abzugrenzen und systematisch zu ordnen, fand Mac Conkey Coli-Stämme, die durch ihr verschiedenes Verhalten gegen Saccharose und Dulcit gekennzeichnet waren. In Anlehnung an Durham (12) bezeichnete er den nur Dulcit vergärenden Typ als Bact. coli communis Escherich, den Saccharose und Dulcit spaltenden Bact. coli communior Durham. Alle Bakterien, die beide Substanzen nicht anzugreifen vermochten, faßte er als Acidi lactici-Gruppe zusammen. Diese Nominierung ist in späteren Veröffentlichungen beibehalten worden.

Nach Hees und Tropp soll das Wachstum auf dem Levineschen Nährboden (19) eine Trennung von Bact. acidi lactici und Bact. coli ermöglichen. Nur auf diese Weise gelang es ihnen, eine Reihe ihrer Stämme, die sich

[1]) Die Untersuchungen wurden teils am Landesgesundheitsamt Rostock, teils am chemischen Untersuchungsamt Reichenbach (Eulengebirge) ausgeführt.

in nichts von dem Bact. acidi lactici unterscheiden ließen, als Saccharose und Dulcit nicht vergärenden Coli-Typ abzutrennen. Diese dritte Coli-Form, die C. O. Jensen (21) bereits unter den bei der Kälberruhr gezüchteten Formen angetroffen hat, ist von Hees und Tropp Bact. coli benannt worden.

Maulhard, der unsere Kenntnisse über Bact. acidi lactici erweitert und manche der in der Literatur vorhandenen Widersprüche aufgeklärt hat, konnte den Beweis erbringen, daß der hier erwähnte, dem Bact. acidi lactici so außerordentlich ähnliche Coli-Typ beweglich ist und nur mit Hilfe dieser Eigenschaft von jenem abgetrennt werden kann. Da Maulhard unter den anderen Spielarten des Bact. coli — sowohl beim Coli communis als auch communior — bewegliche wie unbewegliche Stämme nachgewiesen hat, hat er als erster den Schluß gezogen, daß Bact. acidi lactici als eine Untergruppe des Bact. coli zu betrachten sei. Unter Berücksichtigung der Beweglichkeit hat er die Coli-Gruppe in die Untergruppen Ia und b (Coli communis), IIa und b (Coli communior) und III (Coli) neu eingeteilt, wobei III und Bact. acidi lactici nur durch die Beweglichkeit verschieden sind. Die Gliederung der Coli-Gruppe ist dadurch nicht übersichtlicher, die Nomenklatur nicht einfacher geworden, wie aus Tab. 1 hervorgehen dürfte. Die Auswahl einzelner, nicht gleichartig vergorener Zucker und Alkohole, wie in diesem Falle Saccharose und Dulcit, zur Typisierung des Bact. coli ist eine willkürliche. Zur Systematik der Coli-Gruppe soll daher anderen Ortes noch Stellung genommen werden.

Tabelle 1.

Coli-Untergruppe		Eigenschaften			
nach Hees und Tropp	nach Maulhard	Beweglichkeit	Vergärung von Dulcit	Vergärung von Saccharose	Vergärung von Inosit
Coli communis (Escherich)	Coli Ia	+	+	—	—
Coli communis (Escherich)	Coli Ib	—	+	—	—
Coli communior (Durham)	Coli IIa	+	+	+	—
Coli communior (Durham)	Coli IIb	—	+	+	—
Coli	Coli III	+	—	—	—
Acidi lactici	Acidi lactici	—	—	—	—

Meine Untersuchungen bestanden in erster Linie darin, das Verhalten des Bact. acidi lactici auf synthetischen Nährböden festzustellen und einige bei der Wasseranalyse, vor allem in Amerika gebräuchliche biochemische Reaktionen zur Unterscheidung von Coli- und Aerogeneskulturen auch auf das Bact. acidi lactici anzuwenden. Es handelt sich hierbei um das Wachstum auf Citratnährböden, wie sie von Pesch (38) und Koser (23) empfohlen worden sind, um die Methylrotprobe und die Voges-Proskauersche Reaktion. Die Assimilierung von Zitronensäure stellt an einen Mikroorganismus so hohe fermentative Anforderungen, daß die Fähigkeit heute schon als eine der ausgeprägtesten Eigenschaften eines Bakteriums gelten darf und zur Charakterisierung und Auseinanderhaltung von Coli-, Paracoli- und Aerogenesstämmen bei der Wasseruntersuchung unschätzbare Dienste leistet. Auf diesem Wege konnte daher die Berechtigung zur Eingliederung des Hueppeschen Milchsäurebakteriums in die Coligruppe eine weitere Stütze erfahren, unter Umständen aber auch durch sichere Unterscheidungsmerkmale eine Grundlage für dessen systematische Selbständigkeit geschaffen werden.

Das Wachstum von Bact. acidi lactici auf einigen der gebräuchlichsten festen Nährböden, wie Nährgelatine, Endo-, Drigalski-, Malachitgrün- und gewöhnlichem Agar, ist schon häufiger Gegenstand der Untersuchung gewesen, so daß darüber Klarheit herrscht. (Burri und Mitarbeiter [8], Kozai, Hees und Tropp, Maulhard.) Ich begnügte mich daher neben Endo-Agar, der zur Isolierung der einzelnen Stämme Verwendung fand, mit einer Wachstumskontrolle auf Levine- und Gaßner-Agarplatten. Zur Differenzierung der reingezüchteten Stämme benutzte ich die Beweglichkeit, die Indolbildung und das Gärungsvermögen gegenüber Saccharose, Dulzit und Inosit. Die Beweglichkeit wurde sowohl im hängenden Tropfen als auch in dem von Oldekop (37) angegebenen Neutralrotagar geprüft. Die Indolreaktion wurde in jedem Falle mehrfach ausgeführt. Da über die Vergärbarkeit von Raffinose, Dextrin, Stärke und Inulin noch Unsicherheit herrscht, wurde die Untersuchung auch auf diese ausgedehnt. Zur Vervollständigung und Bestätigung des in dieser Hinsicht schon Bekannten wurde anschließend das Verhalten des Bact. acidi lactici neben Coli und Lactis aerogenes sowohl in dem von Lange (27) hergestellten und zur Trennung von Coli-, Typhus- und Paratyphusstämmen empfohlenen „polytropen Nährboden“ wie auch in der biologischen Reihe einer Prüfung unterzogen.

Experimentelles.

Das zur Untersuchung gelangende Material war sehr verschiedener Herkunft. Aus Milch, Fleischkonserven, Wurst, Speiseeis, Wasser, Harn und Stuhl wurden etwa 60 Stämme reingezüchtet. Eine mehrfach wechselnde Impfung in Bouillon und auf Endoagar mit gleichzeitiger Anfertigung von Gram- und Fuchsinklatschpräparaten garantierte die Reinheit der Stämme. Unter den in Rohwasserproben vorgefundenen Coliformen fanden nur die bei 46° im Eijkmanschen Gärkolben gedeihenden, also Warmblüterstämmen entsprechenden Bakterien Berücksichtigung, die aus den Gärkölbchen über die Endoplatte gezüchtet werden konnten. Unter den Stämmen befanden sich 7 Acidi lactici-, 7 Lactis aerogenes- und 26 echte Colistämme, über deren Herkunft und Eigenschaften Tab. 2 Auskunft gibt.

I. Beweglichkeit.

Die Beweglichkeit wurde im hängenden Tropfen festgestellt; zum makroskopischen Vergleich wurde der durch Maulhards Veröffentlichung wieder zu Ehren gekommene halbfeste Oldekopsche Agar benutzt, der nach der Vorschrift von W. Buchholz (4) als 0,5 proz. Trauben- und Milchzucker-Neutralrotagar Verwendung fand.

Die Reduktion des Farbstoffs scheint nicht allein von der Beweglichkeit, sondern auch von der Gasbildung, insbesondere der Wasserstoffbildung, abhängig zu sein; denn auch die unbeweglichen Bakterien entfärben den Nährboden, wenn auch nach viel längerer Zeit und oft nur unvollkommen. Anderseits sind bewegliche Bakterien, die den im Nähragar vorhandenen Zucker ohne Entwicklung von Gärungsgasen zersetzen, nicht imstande, den roten Farbstoff in einen gelben zu verwandeln. Versuche mit gewissen Paracolistämmen bestätigten das. Bis auf wenige Ausnahmen wurde der mikroskopische Befund im hängenden Tropfen durch den makroskopischen des Oldekopagars ergänzt. Unter den 26 Colistämmen der

Tabelle 2.

Nr.	Stamm	Herkunft	Beweglichkeit		Wachstum auf	
			mikroskopisch	makroskopisch	Gaßner-Agar	Levine-Agar
1	B. acidi lactici	Originalstamm	—	—	dick	dick, zusammenhängend
2	"	Milch	—	—	dick, zusammenhängend	dick, stark schleimig
3	"	"	—	—	flach, breit	etwas größer als B. coli
4	"	Vanilleeis	—	—	dick	dick, stark schleimig
5	"	Urin	—	—	flach, breit	klein
6	"	"	—	—	dick, schleimig	dick, stark schleimig
7	"	Rohwasser	—	—	"	sehr starker Schleim
8	Bact. coli	Originalstamm	+	+	flach, breit	klein, flach, grünglänzend
9	"	"	+	+	"	"
10	"	Stuhl	+	+	"	"
11	"	"	+	+	"	"
12	"	"	—	—	"	"
13	"	"	+	+	"	"
14	"	"	+	+	"	"
15	"	"	+	+	"	"
16	"	"	+	+	"	"
17	"	"	+	+	"	"
18	"	"	+	—	"	"
19	"	"	+	—	"	"
20	"	"	+	+	"	"
21	"	"	—	—	"	"
22	"	Milch	+	+	"	"
23	"	"	+	+	"	"
24	"	"	—	—	"	"
25	"	"	+	+	"	"
26	"	"	+	+	"	"
27	"	"	+	+	"	"
28	"	"	+	+	"	"
29	"	"	+	+	"	"
30	"	"	+	+	"	"
31	"	Rohwasser	+	+	"	"
32	"	"	—	+	"	"
33	"	"	—	+	"	"
34	B. lactis aerogenes	Originalstamm	—	—	dick, stark schleimig	dunkel, mit dick schleimig. Rand
35	"	Milch	—	—	"	"
36	"	"	—	—	"	"
37	"	"	—	—	"	"
38	"	"	—	—	"	"
39	"	Urin	—	—	"	erst klein, dann dick mit schleimigem Rand
40	"	Konservenfleisch	—	—	"	dunkel, mit dickem, schleimigem Rand

Tabelle 2.

Indol-bildung	Vergärung von Dulcit	Inosit	Saccharose	Raffinose	Dextrin	Stärke	Inulin	Wachstum auf Citratagar nach Pesch	Methylrot-probe nach Clark u. Lubs	Reaktion nach Voges-Proskauer
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	(+)	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	(+)	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	(+)	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	+	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	—	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	—	—	—	—	+	+	—
+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—
+	+	—	+	+	—	—	—	—	+	—
+	+	—	—	+	—	—	—	—	+	—
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+
—	+	+	+	+	—	—	—	+	—	+
—	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+
+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+
+	+	+	+	+	—	—	—	+	+	+
—	—	+	+	+	—	—	—	+	+	(+)
—	—	+	+	+	—	—	—	+	—	+

verschiedenen Vergärungsspielarten waren 3 unbeweglich; der Oldekop-agar zeigte außer diesen 2 weitere als bewegungslos und einen unbeweglichen als beweglich an, arbeitete also nicht fehlerfrei. Als Bact. acidi lactici-Stämme wurden, wie üblich, die unbeweglichen, Saccharose und Dulzit nicht zersetzenden Kulturen festgestellt. Ein beweglicher Lactis aerogenes-Stamm wurde nicht angetroffen. Bei letzteren beiden Gruppen stimmten die Resultate beider Prüfungsmethoden überein.

II. Wachstum auf Endo-, Gaßner- und Levineagar.

Auf der Endoplatte bildet Bact. acidi lactici im allgemeinen flache, kräftige Kolonien mit starkem Fuchsinglanz. Alle für Coli charakteristischen Wachstumsformen findet man wieder. Das Zentrum der Kolonien kann flach, erhaben, kraterförmig, dunkel, gelb- oder grünglänzend, der Rand wellig, strahlig, zackig und rosettenförmig sein. Nach einigen Tagen wird der Glanz der Kulturen matter. Die Kolonien zweier Stämme (St. 1 u. 4) nahmen nach 3 Tagen milchigrote Farbe an und zeigten, vor allem bei Strichkulturen, ein deutliches Dickenwachstum. Ein Stamm (St. 7) wuchs auf allen festen Nährböden dick, meist auch schleimig und wies große Ähnlichkeit mit den Aerogenes-Stämmen auf. Nach seinen sonstigen Eigenschaften mußte er unbedingt als Milchsäurebakterium angesprochen werden.

Das Wachstum von Bact. acidi lactici auf Nähragar nach Gaßner war nicht einheitlich. 2 Stämme (St. 3 u. 5) unterschieden sich in keiner Weise von Bact. coli; auf dem Nährboden wurden die für dieses typischen flachen und breiten, in der Aufsicht milchiggrünen Kolonien beobachtet. Die übrigen Stämme wurden zu einer mehr oder weniger kräftigen Schleimbildung angeregt, so daß die gewölbten Kolonien häufig ineinander übergingen. Lactis aerogenes war in allen Fällen durch seine stark schleimige, dicke Kolonieform unverkennbar. Auf einigen Platten machte sich der Schleim schon im Unterschied der Farbe durch einen das dunkelgrüne Zentrum umgebenden hellen Rand bemerkbar.

Ähnlich war das Verhalten der einzelnen Gruppen auf Levine-Agar, einem Laktose-Eosin-Methylenblau-Agar mit Zusatz von Spuren Kristallviolett (Herstellung s. Hees und Tropp, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 100. S. 276). Während die Colistämme ohne Ausnahme sehr kleine, dunkle, metallisch glänzende Kolonien lieferten und Bact. lactis aerogenes große Kolonien mit wenig zentralen Farbpunkten und dickem, rötlich oder bläulich durchscheinenden, schleimigem Rande bildete, nahm Acidi lactici wieder eine Mittelstellung ein. Bei 4 Stämmen wurden die von Hees und Tropp beschriebenen Merkmale bestätigt gefunden. Die Kolonien wuchsen vielfach zusammenhängend oder konfluierten bald. Im Zentrum machte sich grüner Glanz, an der Peripherie bläulich-milchiger Schleim bemerkbar. Von den übrigen 3 Stämmen näherten sich 2 (St. 3 u. 5) dem Colityp. Bei St. 3 waren die Kolonien noch ziemlich groß, ihr Rand bläulichweiß. St. 5, der sich im allgemeinen durch ein langsames Wachstum auszeichnete, war morphologisch auch nach 3 Tagen nicht von Bact. coli zu unterscheiden. Der Anstoß zur Schleimbildung muß auch hier vorgelegen haben, da die Kolonien stark fadenziehend waren. Der restliche St. 7 erzeugte auf diesem Nährboden so große Schleimmengen, daß die Kolonien nach 2 Tagen völlig zerflossen waren und abtropften. Es sei erwähnt, daß auch Maulhard nicht sonderlich gute Erfolge mit dem Levine-Agar erzielt hat, da nach seinen Angaben Coli und Acidi

lactici nur bei großer Übung auseinandergehalten werden können. Die Anregung der Mehrzahl der Acidi lactici-Stämme zur Schleimbildung durch Gaßner- und mehr noch Levine-Agar ist eine immerhin beachtenswerte Tatsache, zu der weiter unten Stellung genommen wird.

III. Indolbildung.

Der Nachweis von Indol geschah mit Hilfe von Trypsinpeptonwasser. Als Reagens diente p-Dimethylamidobenzaldehyd. Die Prüfung geschah entweder in der von Frieber (15) vorgeschlagenen Ausführung oder durch Zugabe von je 10 Tropfen 3 proz. alkoholischer Aldehydlösung und je 5 Tropfen konz. Salzsäure zu je 2,5 ccm Peptonwasser nach 24- und 48-stündiger Bebrütung. Die Reaktion wurde stets sehr schnell ausgelöst und erreichte nach 5—10 Min. die stärkste Intensität. Kaliumpersulfat ist zwar entbehrlich. Ein Zusatz von 3—4 Tropfen einer gesättigten Lösung fördert aber die Kondensationsgeschwindigkeit der Komponenten und steigert die Empfindlichkeit der Reaktion. Da es sich bei so geringen Mengen an Nährbodenflüssigkeit nach de Graaff (17) nur um Bruchteile von mg Indol handelt, ist der Prozentgehalt der Aldehydlösung viel weniger wichtig als ein ausreichender Salzsäurezusatz.

Alle Coli- und Acidi lactici-Stämme waren durch Indolbildung ausgezeichnet; bei letzteren war die entstandene Indolmenge häufig geringer, was wohl auf langsameren Abbau des Peptons bzw. Tryptophans zurückzuführen ist. Unter den untersuchten Aerogenes-Kulturen befanden sich 2 aus Milch gleicher Herkunft gezüchtete Stämme (St. 37 u. 38), die sehr starke Indolbildner waren und nach Monaten noch gleich gute Reaktionen hervorriefen.

IV. Vergärung von Dulzit, Inosit, Saccharose, Raffinose, Dextrin, Stärke und Inulin.

Die allgemein übliche Methode zur Einteilung der Coligruppe in ihre bekanntesten Spielarten, die auch hier beibehalten wurde, stützt sich auf deren ungleiches Vergärungsvermögen gegenüber Saccharose und Dulzit. Zur einwandfreien Identifizierung der nach ihrem Verhalten auf den festen Nährböden bereits als Lactis aerogenes-Stämme angesehenen Reinkulturen wurde der Inosit, ein hydroaromatischer Alkohol (Hexaoxyhexahydrobenzol), ausgewählt. Die Spaltbarkeit dieses Alkohols durch Lactis aerogenes ist eines der wesentlichen Unterscheidungsmerkmale von Coli. In der Literatur wird nur von Hees und Tropp ein einzelner Colistamm erwähnt, dem die Fähigkeit zukam, diese Substanz für seinen Stoffwechsel nutzbar zu machen.

Zur Feststellung des Gärvermögens der einzelnen Mikroorganismen bediente ich mich der Reichenbachschen (41) Pepton-Asparagin-Lösung mit Azolithmin als Indikator, die die einzelnen Testsubstanzen in 0,5 proz. Lösung enthielt. Um auch einen Überblick über die Geschwindigkeit der Kohlehydrat- bzw. Alkoholspaltung zu erlangen, wurden die mit Bouillonkulturen beimpften und bei 36° bebrüteten Röhrchen in bestimmten Intervallen, nach 12, 18, 24, 30, 36, 48 und 60 Std. kontrolliert. Im allgemeinen fand der Abbau der Kohlenstoffsubstanz und damit der Farbumschlag des Nährbodens von violett in rot im Verlaufe der ersten 24 Std. statt. Einige Stämme waren nur für den einen oder anderen Körper langsame Vergärer

und brauchten für die Erzeugung der zur Rötung notwendigen Milchsäure 36—60 Std.

Die 3 verschiedenen Colitypen wurden unter dem Material in annähernd gleicher Häufigkeit angetroffen. Dulzitvergärer (Bact. coli communis bzw. coli I, s. o.) fanden sich 7. Saccharose und Dulcit spalteten 11 Stämme (Bact. coli communior bzw. coli II), von denen 2 (St. 25 u. 26) die Saccharose erst nach einigen Tagen zu zerlegen vermochten. 2 weitere Stämme (St. 21 und 33) gehörten anderen Coliuntergruppen an. Außer den Acidi lactici-Stämmen waren auch 6 bewegliche Colistämme (Bact. coli bzw. coli III) nicht imstande, beide Substanzen abzubauen. Burri und Düggeli erwähnen zwar, daß 3 ihrer Acidi lactici-Stämme, wenn auch schwierig, die Saccharose zu vergären in der Lage waren. An frisch gezüchteten Stämmen hat sich ein ähnliches, derartig auffälliges Verhalten nicht wieder auffinden lassen, wenn man von dem etwas gewaltsamen Verfahren von T. W. Twort (48) absieht, der einen Acidi lactici-Stamm durch dauerndes Fortzüchten auf saccharosehaltigen Nährböden zur Spaltung dieses Zuckers brachte. Das Bact. lactis aerogenes zerlegte bei meinen Versuchen stets Saccharose und in 4 Fällen auch Dulzit.

Über die Raffinosevergärung gibt die Literatur verschiedenartige Auskunft. Kligler erwähnt, daß von einem Teile der Laktosespalter Raffinose abgebaut werden kann, während Segin (45) unter einer Reihe von Colibakterien bei Verwendung von Barsiekow-ähnlichen Nährböden keinen Dulzit und Raffinose vergärenden Stamm beobachtet hat. C. O. Jensen, dessen Resultate von Burk (5) bestätigt wurden, hat bei einer Anzahl seiner Kulturen stets eine gemeinsame Spaltung von Raffinose und Saccharose festgestellt und bereits darauf hingewiesen, daß dieses verschiedene Gärungsvermögen als Basis einer Gruppierung der zur Coligruppe gehörenden Formen benutzt werden könnte, deren eine Untergruppe die Saccharose und Raffinose angreifenden Stämme umfaßt. Die Raffinose wird bei vorsichtiger Hydrolyse in Melibiose und Fruktose gespalten. Die Melibiose ihrerseits, die ebenso wie Milchzucker in d-Glukose und Galaktose zerlegbar ist, wird nach Jensen ausnahmslos unter Säure- und Gasentwicklung von Bact. coli assimiliert. Diese Tatsache erklärt, daß allen Saccharosespaltern auch eine Vergärung der Raffinose zukommen muß, wenn aus dem Molekül dieses Trisaccharides durch Fermententwicklung Fruktose abgespalten wird. Denn sowohl diese, als auch die in beiden Fällen verbleibenden Restteile, bei der Saccharose die Glukose, bei der Raffinose die Melibiose unterliegen mit Leichtigkeit dem Abbau. Auch bei diesen Versuchen waren nur Dulzit und Saccharose spaltende Colistämme, die also dem Bact. coli communior bzw. coli II gleichzusetzen sind, imstande, auch Raffinose anzugreifen. Segin kann demnach nur Bakterien vom Typus Bact. coli bzw. coli III in Händen gehabt haben. Die beiden Stämme 25 und 26, die Saccharose erst nach einigen Tagen zersetzten, konnten Raffinose nicht abbauen.

Eine Sonderstellung kommt nach den Ergebnissen den beiden Colistämmen 21 und 33 zu. St. 33 war zwar aggressiv gegen Dulzit und Raffinose, vermochte aber Saccharose auch nach 4 tägiger Bebrütung nicht zur Spaltung zu bringen; dieser einzigartige Fall kann eine zweifache Erklärung finden: Entweder war für diesen Mikroorganismus die Abspaltung von Fruktose nur aus dem Molekül der Raffinose, nicht aber der Saccharose

möglich, oder, was wahrscheinlicher ist, die Zerlegung der Raffinose ist nicht auf dem üblichen Wege vor sich gegangen.

Durch Emulsin kann beispielsweise auch eine Hydrolyse dieses Zuckers in d-Galaktose und Saccharose erfolgen. Bei einem derartigen Abbau würde nur die Galaktose, nicht aber die Saccharose weiter verändert werden, da sie als Kohlenstoffquelle in der Nährlösung von dem fraglichen Stamme unvergoren blieb. Aus Zeitmangel konnte diese Vergärungsform der Raffinose zunächst nicht weiter verfolgt werden.

Der andere Stamm, 21, besaß ein Spaltungsvermögen für Saccharose und Raffinose, ließ aber Dulzit unzersetzt. Derartige saccharosepositive und dulzitnegative Colivarianten gehören einer neuen, bisher nicht berücksichtigten Coli-Untergruppe an; sie sind nur von C. O. Jensen als pathogene Formen beobachtet worden und scheinen sehr selten zu sein. Von Bact. acidi lactici wurde Raffinose ebensowenig wie Saccharose zerlegt, während die Lactis aerogenes-Stämme dazu ohne weiteres imstande waren. Gegenüber Inosit war das Verhalten völlig eindeutig; denn nur von den Aerogenes-Stämmen wurde diese Substanz vergoren.

Dextrin und ganz ausnahmsweise auch Stärke zerlegende Colibakterien sind bereits von Mac Conkey erwähnt worden. Kligler hat unter laktosespaltenden Colistämmen auch Inulinvergärer angetroffen. Stärke gegenüber verhielt sich Coli nach Pfaundler (40) völlig negativ, während Kodoma und Takeda (24) eine sehr schwache Spaltungswirkung bemerkt haben. Unter meinen Kulturen war der St. 18, vom Typ Bact. coli bzw. coli III, befähigt, Dextrin innerhalb 18 Std. zu zersetzen. Ein anderer, St. 16, vom Typ Coli communior bzw. coli II, kam über einen schwachen und sehr langsamen Abbau, der die Nährlösung nach 3 Tagen rotviolett färbte, nicht hinaus. Zu Beginn des Wachstums bestand bei verschiedenen Bakterien die Tendenz, den Nährboden zu röten. Die erfolgende Stickstoffspaltung veränderte aber den Farbton wieder bis violett, eine vielleicht sehr schwach aufgetretene Vergärung so verdeckend. Stärke und Inulin wurden vom echten Colibakterium nicht ausgenutzt. Alle 3 Polysaccharide waren weder für Bact. acidi lactici noch für Bact. lactis aerogenes angreifbar.

V. Gasbildung und Farbstoffreduktion im „polytropen" Nährboden nach Lange (27).

Die Menge und Zusammensetzung der Gärungsgase der Coli-Aerogenes-Gruppen bei Verwendung zuckerhaltiger Nährböden haben bereits Burri und Düggeli mit Hilfe von 2proz. Traubenzuckeragar zum Gegenstand einer eingehenden Untersuchung gemacht. Danach war die gebildete Gasmenge bei Coli und Acidi lactici gleichartig und verhältnismäßig gering. Der darin enthaltene Wasserstoff betrug volumetrisch immer ein Mehrfaches der vorhandenen Kohlensäure. Bei Lactis aerogenes wurden von ihnen im Gegensatz hierzu gleiche Volumina beider Gase, oft sogar ein Überwiegen von Kohlendioxyd analytisch nachgewiesen. Nach Frieber (16) kann bei Berücksichtigung der durch die Flüssigkeit absorbierten Gasanteile das Verhältnis von $H_2 : CO_2$ methodisch als Unterscheidungsmerkmal zwischen nahe verwandten Bakterienarten dienen.

Der von Lange als „polytrop" bezeichnete Nährboden fand bei den Untersuchungen Berücksichtigung, weil er gleichzeitig den Nachweis von

Säure- und Gasbildung und Farbstoffreduktion ermöglicht. Er enthält Milchzucker (1%), Mannit (0,05%) und als Indikatoren Azolithmin und Neutralrot in Bouillonlösung. (Herstellung des Nährbodens s. Haendel und Lange [27].)

Reagenzröhrchen (mit je 6 ccm) und Uhlenhut-Rohrchen wurden mit dem fertigen Nährboden beschickt und letztere, die als anaerobe Schenkel fungierten und Kubikzentimeter-Markierungen trugen, rasch umgestulpt in die Reagenzglaser geworfen. Bei einiger Geschicklichkeit erreicht man, daß die kleineren Rohrchen vollständig mit Nährboden gefüllt sind. Nach kurzer Sterilisierung wurden die Reagenzröhrchen mit einigen Tropfen Bouillon-Reinkultur beimpft und bebrütet. Die Markierungszeichen der kleineren Rohrchen erlaubten wahrend der Bebrütung eine Kontrolle der anaerob entstandenen Gasmengen.

Säurebildung und Farbstoffumschlag bzw. -reduktion fand bei allen 3 Bakteriengruppen statt. Der im Reagenzglas befindliche, dem Luftaustausch zugängliche Teil des Nährbodens wurde zinnoberrot, orange, in einigen Fällen auch gelb gefärbt; im Uhlenhut-Röhrchen schritt die Reduktion fast stets bis gelb, mindestens aber bis hellorange fort. Die im anaeroben, etwa 4.3 ccm fassenden Röhrchen gesammelten Gärungsgase, die nur als relative Werte zum Vergleich zu betrachten sind, wurden von Coli und Acidi lactici-Stämmen in etwa gleich großen Mengen erzeugt und schwankten zwischen einem Volumen von 2,0 und 2,9 ccm. Die Lactis aerogenes-Kulturen lieferten bis auf 2 Ausnahmen mit 2,6 und 2,7 ccm so reichliche Mengen Gärgase, daß die Röhrchen vollständig damit angefüllt waren. Die Zerlegung von Laktose und Mannit durch die verschiedenen Arten ging demnach hinsichtlich der Gasmenge mit den von Burri und Düggeli angestellten Versuchen parallel; wahrscheinlich trifft das auch auf die einzelnen Bestandteile zu, auf deren Analyse hier verzichtet wurde.

VI. Wachstum auf Citratagar nach Pesch.

Über das Verhalten von Bact. acidi lactici auf synthetischen, besonders Citratnährböden ist meines Wissens noch nichts bekannt, obwohl derartige feste und flüssige Nährböden neuerdings in die bakteriologische Diagnostik Eingang gefunden haben und zur Trennung von Coli und Aerogenes bereits erfolgreich verwendet worden sind. Zahlreiche Arbeiten von Koser (23), Pesch (39), H. Braun (6), Simmons (46), Leiter (30), Minkewitsch, Trofimuk und Wedonjapin (33) geben darüber Aufschluß. Das echte Bact. coli ist bei Gegenwart bestimmter Stickstoffverbindungen im Gegensatz zum Bact. lactis aerogenes und coliartigen, aus fäkal nicht verunreinigtem Boden gezüchteten Bakterien nicht imstande, die Zitronensäure als C-Quelle zu assimilieren. Diese Eigenschaft ist ein sehr charakteristisches und konstantes Merkmal des Warmblütercolis.

Für die Versuche wurde der von Pesch angegebene Ammoniumchlorid-Citratagar ausgewählt, der als N-Quelle 0,16% Ammoniumchlorid, als C-Quelle 1,0% Natriumcitrat enthält (Vorschrift s. Pesch, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 111. S. 171). Die Beimpfung der Platten geschah durch Aufschwemmung frischer Agarkulturen in physiologischer Kochsalzlösung und Ausspatelung dieser Lösung, die Kontrolle der Platten nach 24-, 48- und 72 stünd. Bebrütung. Unter den 26 Colistämmen bildete ein einziger, St. 25, durch Wachstum in Form von kräftigen, weißen Kolonien eine Ausnahme; alle übrigen brachten auf den Platten nur einen winzigen,

hauchartigen Belag hervor. Ebensowenig waren 6 von den 7 Acidi lactici-Stämmen in der Lage, auf diesem Nährboden zu gedeihen. St. 2 nahm insofern eine Sonderstellung ein, als er neben sehr vielen winzig kleinen auch einige größere, flache und ziemlich breite Kolonien erzeugte, die nach dem Befunde aber nur als zweifelhaftes Ergebnis angesprochen werden können. Bact. acidi lactici ist also auf diesem sehr spezifischen Nährboden nicht von Bact. coli zu unterscheiden. Dieser Tatsache wird unter den Beweismitteln für die Zugehörigkeit des Milchsäurebakteriums zur Coligruppe eine besondere Bedeutung zukommen müssen. Die Aerogenes-Stämme waren sämtlich durch Bildung saftiger, weißer, oft seidig glänzender Kolonien gekennzeichnet.

VII. Die Methylrotprobe.

Die Methylrotprobe beruht bekanntlich auf der Feststellung der Wasserstoffionenkonzentration eines flüssigen Nährbodens mit Hilfe von Farbenindikatoren. Bei bestimmter Zusammensetzung eines solchen Nährbodens läßt sich durch Bakterienwirkung eine Endreaktion erreichen, die in die Nähe des Neutralpunktes gewisser Indikatoren verlegt werden kann, infolge des verschiedenartigen Abbaus der einzelnen Bakteriengruppen aber meist in das schwach saure oder schwach alkalische Gebiet des betreffenden Indikators gerät und Farbunterschiede verursacht. Durch Verwendung von flüssigen synthetischen oder Peptonnährböden nach Clark und Lubs (9) lassen sich Coli- und Aerogenes-Stämme dadurch unterscheiden, daß erstere saure, letztere alkalische Endreaktionen hervorrufen.

Minkewitsch, Trofimuk und Wedenjapin geben in ihrer Arbeit „Über die Bedeutung der zweifachen Herkunft der Bakteriengruppe Coli aerogenes für die sanitäre Beurteilung des Trinkwassers“ folgende Erklärung der Methylrotprobe: „Die Coli-Untergruppe zerlegt Glykose unter Bildung von CO_2 und H_2 in annähernd gleiche Volumenteile, so daß das Verhaltnis $CO_2 : H_2$ klein bleibt und im Durchschnitt 1,06 beträgt. Dieser Bestand des Gasgemisches in gezuckerten Bouillonkulturen des Bact. coli bedingt letzten Endes saure Reaktion des Nährbodens gegen Paranitrophenol oder Methylrot (ph = 5). Dagegen bildet Bact. aerogenes aus Glykose 2—3mal mehr CO_2 als H_2 im Verhältnis von $CO_2 : H_2 = 1,9—3$. Ein solcher Bestand des Gasgemisches in Glykosebouillonkulturen des Bact. aerogenes bedingt es, daß die Endreaktion in die alkalische Zone der erwähnten Indikatoren verlegt wird.“

Diese Definition trifft die Deutung der durch Coli und Aerogenes hervorgerufenen Endreaktion in Glukosenährböden nicht und muß zu Mißverständnissen Anlaß geben. Der Unterschied der entstandenen Gärgase übt natürlich nur indirekt eine Wirkung auf den Indikator aus. Die geringen, bei Bruttemperatur gelösten Kohlensäure- und Wasserstoffmengen können die Reaktion der Bouillonlösung kaum beeinflussen. Der Abbau der Glukose, sicher auch anderer Zuckerarten, durch die genannten Bakterien geht vielmehr so vor sich, daß das Bact. lactis aerogenes aus einem größeren Anteil der bei der Vergärung entstehenden Zwischen- und Endprodukte, organischen Säuren, die Carboxyl(CooH-)gruppen durch CO_2-Abspaltung zu zerlegen imstande ist, wodurch der Säuregehalt des Nährbodens verringert und seine Wasserstoffionenkonzentration nach der alkalischen Seite verschoben wird. Auch die von Clark und Lubs beobachteten Stämme, die nur CO_2 als gasförmiges Spaltprodukt bilden, müssen demnach eine alkalische Endreaktion hervorrufen, was auch mit der Theorie im Einklang steht. Je mehr Kohlensäure gebildet wird, desto weniger Gesamtsäure bleibt erhalten. Zwischen beiden Faktoren besteht zwar kein absolutes, aber ein

relatives reziprokes Verhältnis. Die quantitativen Milchsäurebestimmungen von Maulhard in Coli-, Acidi lactici- und Aerogenes-Glukosekulturen bieten hierfür eine wertvolle Bestätigung. Bei Versuchen mit je 6 Stämmen der 3 Gruppen wurden im Durchschnitt von Bact. coli 32,5%, von Bact. acidi lactici 39,6% und von Bact. lactis aerogenes nur 23,3% der Glukose zu Milchsäure umgesetzt. Durch analytische Erfassung sämtlicher bei derartigen Vergärungen entstehenden organischen Säuren würden die Unterschiede sicher noch eindeutiger zutage treten.

Ich benutzte eine nach Clark und Lubs hergestellte, je 0,5% Pepton Witte, Dikaliumphosphat und Glukose enthaltende Nährlösung, die zu je 5 ccm in Röhrchen abgefüllt wurde. Die beimpften und 4 Tage im Brutschrank bei 36° aufbewahrten Röhrchen wurden dann mit 5 Tropfen 0,2 prom. Methylrotlösung versetzt. Die mit Bact. coli beimpften Röhrchen zeigten sämtlich saure, also positive Reaktion. Die Farbe war meist (in 22 Fällen) hellrot, bei 3 Stämmen rotorange. Bei dieser Gelegenheit wurden die einzelnen Röhrchen bis zum isotonischen Punkt des Indikators, für Methylrot (ph) = $10^{-5,5}$, bei saurer Reaktion mit n/10 Lauge, bei alkalischer mit n/10 Säure titriert. Das geschah, um einen annähernden Anhaltspunkt für die Säuerung des Nährbodens, die Abweichung der Stämme vom Neutralpunkt und untereinander zu gewinnen. Die den Nährboden rotorange färbenden Kulturen verbrauchten für 5 ccm Flüssigkeit 0,23—0,25 ccm n/10 Natronlauge, die rot färbenden 0,3—0,5 ccm. Die Einwirkung von Bact. acidi lactici war ganz ähnlich. 6 mal war die Endreaktion sauer, also positiv, einmal fast neutral. Der Farbton schwankte zwischen hellrot (4 mal), rotorange (2 mal) und orangefarben (1 mal). Titriert wurden für die Neutralisation der Röhrchen mit rotem Farbton 0,3—0,45 ccm, der rotorangefarbenen 0,22—0,25 ccm; das fast neutrale Röhrchen lieferte bei Zugabe von 0,1 ccm Natronlauge bereits den Neutralpunkt, was auch in die Richtung der sauren, also positiven Reaktion deutet. Es sei bemerkt, daß es sich hier um den sehr langsam wachsenden Stamm 5 handelte. Bei den Lactis aerogenes-Stämmen wurde die merkwürdige Beobachtung gemacht, daß nur 3 das Methylrot gelb färbten, während die übrigen eine schwach saure, orangerötliche Indikatorfarbe hervorriefen. Die gelben, negativen Röhrchen wurden durch 0,7—0,5 ccm n/10 Salzsäure neutralisiert, die 4 schwach positiv ausgefallenen Kulturen dagegen durch 0,2—0,25 ccm n/10 Natronlauge. Bei der geringen Zahl von untersuchten Aerogenes-Stämmen kann kein Urteil über die Zuverlässigkeit der Methylrotprobe gegeben werden, da von anderen Forschern wesentlich günstigere Resultate erzielt wurden.

VIII. Reaktion nach Voges und Proskauer.

Der Voges-Proskauerschen (40) Reaktion liegt die Entstehung von Gärungsprodukten zugrunde, die in zuckerhaltigen Bouillonkulturen eosinähnliche Färbungen hervorrufen, die man durch Zusatz von Alkalien vertiefen kann. Zur Ausführung der Reaktion diente der schon für die Methylrotprobe verwendete Nährboden (je 5 ccm) nach Clark und Lubs. Nach 4 tägiger Bebrütung wurde solchen Kulturen die gleiche Menge (5 ccm) 10 proz. Kalilauge zugefügt. Vor der Prüfung auf Färbung der Röhrchen erfolgte eine weitere 12 stünd. Aufbewahrung im Thermostaten. Sämtliche Coli- und Acidi lactici-Kulturen waren schwach gelblich bis höch-

stens hellgelb gefärbt, reagierten also negativ. 6 Lactis aerogenes-Stämme erzeugten eosinähnliche Farbtöne. Ein Stamm, 39, ergab eine so geringe Andeutung an Eosin, daß der Ausfall der Probe als fraglich zu bewerten war.

Die Methylrotprobe war bei meinen Versuchen demnach viel weniger zuverlässig als die Züchtungsergebnisse auf Citratagar, während die Voges-Proskauersche Reaktion recht zufriedenstellend ausfiel. Koser machte mit letzterer wie auch der Methylrotprobe weniger gute Erfahrungen. Von 72 Coliformen (Aerogenes) — Bodenbakterien konnten nach seinen Angaben 70 Citronensäure verwerten, während nur etwas über 50% konstant farbstoffpositiv und methylrotnegativ waren. Auch Pesch bezeichnete beide Reaktionen in ihrem Ausfall als weniger sicher und dem Nachweis der Ausnutzbarkeit von Citratagar deutlich unterlegen.

IX. Wachstum in der biologischen Reihe.

Zur Vervollständigung der Resultate wurde das Verhalten einer Anzahl von Kulturen jeder Gruppe im biologischen Reihenversuch kontrolliert. Da die in den einzelnen Nährböden enthaltenen Kohlehydrate von den verschiedenen Gruppen gleich gut gespalten werden, war es vorauszusehen, daß wesentliche Unterschiede der einzelnen Röhrchen nicht vorhanden sein konnten. Nur Bact. lactis aerogenes war in der Mehrzahl der Fälle infolge der stärkeren Gasbildung im Gärröhrchen und der ebenfalls darauf beruhenden intensiveren Sprengung von Methylenblau-Milchzucker- und Neutralrot-Traubenzucker-Agar erkennbar. Irgendwelche zuverlässigen Unterscheidungsmöglichkeiten auch nur zwischen Coli- und Aerogeneskulturen bietet die biologische Reihe nicht.

Eigenschaften des Bact. acidi lactici.

Faßt man die mit Sicherheit festgestellten Eigenschaften des Hueppeschen Milchsäurebakteriums zusammen, so läßt sich dieses aus der bisher vorliegenden Literatur und den ausführlich besprochenen Ergebnissen dieser Arbeit, die in mancher Richtung hin zur Ergänzung und Vervollständigung des Bildes über diesen Mikroorganismus beitragen soll, folgendermaßen charakterisieren:

Bact. acidi lactici Hueppe ist ein unbewegliches, gramnegatives, mittellanges, sporenfreies Stäbchen. In Bouillon erfolgt diffuse Trübung ohne wesentlichen Bodensatz. Auf der Gelatineplatte entwickeln sich die einzelnen Keime zu flachen, breiten, „weinblattartigen“ Kolonien. Eine Verflüssigung der Platte findet nicht statt (Maulhard). Malachitgrünagar und die Indikatornährböden nach Endo und Drigalski-Conradi rufen die für coliartige Laktosevergärer charakteristischen Färbungen und Wuchsformen hervor. Durch Gaßner- und mehr noch Levine-Agar wird die Mehrzahl der Stämme im Gegensatz zu Bact. coli zu einer kräftigen Schleimbildung angeregt, welche die dunkelgrünen bzw. bläulich-milchigen Kolonien häufig zusammenfließen läßt. Bei Züchtung in Peptonwasser wird Indol gebildet. Negativer Ausfall der Indolreaktion ist bei Verwendung des in der Praxis gebräuchlichen Peptonwassers als Nährboden noch nicht beobachtet werden. Kürzlich hat Acklin (1) eine Nährlösung zum gleichzeitigen Nachweis von Vergärung, Gasbildung und Indolbildung empfohlen, mit deren Hilfe er Colibakterien aus dem menschlichen Darm von Tiercoli unterscheiden konnte. Dabei hat er mit Bact. acidi

lactici kein Indol nachweisen können. Dieses Ergebnis steht in Widerspruch zu den Befunden aller anderen Forscher und bedarf für seinen Nährboden noch der Nachprüfung und Bestätigung. Da Indol und Phenol sich ausschließen (Rhein [42], Laux [28], Fabry [14]), dürfte letzteres kaum unter den Abbaustoffen vorhanden sein. Der Nachweis von Phenol ist daher auch stets vernachlässigt worden. In Bouillon entsteht in geringer Menge auch Schwefelwasserstoff; in Peptonbouillon läßt eine äußerst schwache Bleisulfidreaktion nur Spuren vermuten (Stagnitta-Balistreri [47], Rubner [44]). Hämolysierende Stämme scheinen selten zu sein, da diese Eigenschaft bisher nur von einem Stamm feststeht (Maulhard). Die Zerlegung von Zuckerarten und verwandten Substanzen findet unter Gasbildung und Säuerung des Nährbodens statt. Die erzeugte Säuremenge ist größer, die Gasentwicklung geringer als bei Bact. lactis aerogenes. Infolgedessen fällt die Methylrotprobe positiv aus (saure Endreaktion des Nährbodens nach Clark und Lubs). Vergoren werden die Kohlehydrate d-Glukose, d-Galaktose, d-Mannose, d-Fruktose, L-Arabinose, L-Xylose, L-Rhamnose, Laktose und Maltose, die höherwertigen Alkohole Glyzerin, Sorbit und Mannit. Infolgedessen erfahren in der biologischen Reihe durch Abbau der hierzu verwendeten vergärbaren Kohlehydrate die Indikatoren der Nährmedien entsprechende Farbumschläge. Nicht spaltbar sind Saccharose, Raffinose, Dextrin, Stärke, Inulin, Erythrit, Dulzit und Inosit (MacConkey, Kligler, Hees und Tropp, Maulhard). Der fünfwertige Alkohol Adonit und das Glukosid Salizin verdienen besondere Beachtung, da sie nur von einem Teile der Acidi lactici-Stämme ausgenutzt werden können. Unter den methylierten Monosen findet bei β-Methylglukosid zuweilen, bei α- und β-Methylgalaktosid fast immer, bei ersteren beiden allerdings sehr langsam, Vergärung statt. Die übrigen bisher geprüften substituierten Kohlehydrate sowie Schwefelzuckerverbindungen werden nicht angegriffen (Hees und Tropp).

Unter den Gärprodukten sind neben Milchsäure nur die gasförmigen Bestandteile näher untersucht worden. Sie bestehen aus Wasserstoff und Kohlendioxyd. Ihre Mengenverhältnisse wechseln je nach Beschaffenheit des dargebotenen Gärmaterials. Bei Verwendung von 2 proz. Traubenzuckeragar überwiegt stets der Wasserstoff um ein Mehrfaches (Burri und Düggeli). In flüssigen, ebenfalls Glukose enthaltenden Nährmedien sind die Volumina beider Gase etwa gleich groß (Clark und Lubs). Die entstehende Äthylidenmilchsäure ist bei Benutzung eines Pepton-Glukose-Kaliumphosphat-Nährbodens in allen Fällen L-Milchsäure. Die aus zuckerreichen (6 proz.) Lösungen durch das Bakterium zu Milchsäure umgesetzte Glukose (39,6%) ist unter gleichen Verhältnissen beträchtlicher als bei Coli und besonders bei Lactis aerogenes (Maulhard). Über die bei der Zuckerspaltung weiterhin produzierten organischen Säuren liegen trotz mancher Hinweise absolut sichere Resultate noch nicht vor.

Die wirksame Substanz der Voges-Proskauerschen Reaktion wird bei Benutzung des Nährbodens nach Clark und Lubs als Spaltprodukt nicht gebildet. Ob es sich bei dieser Substanz um das Azetyl-Methyl-Carbinol handelt, ist nach der Veröffentlichung von Bonalberti (3) in Frage gestellt worden.

Unter den als Kohlenstoffquelle in Frage kommenden Fettsäuren ist bisher als einzigste, aber gleichzeitig wichtigste, die Zitronensäure benutzt

worden. Wird sie als alleinige C-Quelle mit Ammoniumchlorid als N-Quelle in Form eines Nährbodens nach Pesch dem Bact. acidi lactici dargereicht, so kann sie von diesem nicht verwertet werden.

Pathogen wirkende Stämme kommen in gleicher Häufigkeit wie bei Bact. coli vor. Da die Acidi lactici-Untergruppe serologisch eine Einheitlichkeit vermissen läßt, ist es verständlich, daß der Nachweis einer Verwandtschaft zu Bact. coli bzw. Bact. lactis aerogenes auf diesem Wege bislang fehlgeschlagen ist (Maulhard). Die Herkunft der bisher aus mannigfachem Material reingezüchteten Kulturen bietet keinerlei Anhaltspunkte zu irgendwelchen Unterscheidungsmerkmalen.

Systematische Stellung des Bact. acidi lactici Hueppe.

Als wichtigstes Beweismittel für die Zugehörigkeit des Bact. acidi lactici zur Gruppe des echten Colibakteriums hat sein Verhalten auf synthetischen Nährböden mit zitronensauren Salzen als Kohlenstoffquelle zu gelten. Die Assimilierbarkeit von Zitronensäure bei gleichzeitiger Darbietung einer geeigneten Stickstoffquelle kommt einer ganzen Reihe dem Bact. coli mehr oder weniger nahestehender Mikroorganismen zu. Als gute Zitratspalter gehören hierher Bact. lactis aerogenes, Bact. cloacae (Jordan), aerogenes- und coliähnliche Gräser- und Bodenbakterien und die Paracoligruppe. Bact. coli und Bact. acidi lactici können Zitronensaure nicht verwerten. Dieser biochemische Mangel bietet dem Bakteriologen ein äußerst wertvolles Hilfsmittel zur Begrenzung der gesamten Coligruppe. Pesch, Koser, H. Braun, Simmons, Leiter, Minkewitsch und Mitarbeiter (34) berichten über die Erfolge mit Zitratnährböden. Ob man einen derartigen Nährboden in flüssiger (Koser) oder fester Form (Pesch, Simmons) zur Differenzierung benutzt, ist weniger wesentlich. Nach Koser waren 108 Colistämme fäkaler Herkunft, nach Pesch etwa 50, sämtlich zitratnegativ; Leiter stellte unter 332 Warmblütercolistämmen bei 98,9% im Zitratmedium kein Wachstum fest, während z. B. nur 90% eine positive Indolreaktion gaben. Es ist von besonderem Interesse, daß die Zitratprobe eine Unterscheidung von Fäkalcoli und coliartigen Bodenbakterien gestattet. Von 72 aus dem fäkalfreien Boden abgelegener Wälder isolierten, als Coli angesprochenen Stämmen entwickelten sich nach Koser 70 in seinem flüssigen Zitratnährboden. Eine ähnliche Beobachtung machte ich bei Stämmen, die Milchzucker mit oder ohne Gasbildung zerlegten, also Endo-Agar röteten, zum Teil Indol bildeten und auch sonst coliähnliches Verhalten zeigten. Durch Wachstum auf Zitratagar nach Pesch ließen sie sich sämtlich von der Coligruppe trennen. An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, daß von einigen Verff. (Pesch) auch verschiedene Milchzucker nicht vergärende coliähnliche Darmbakterien der Coligruppe zugeteilt werden. Im Gegensatz hierzu sind von mir alle Stämme, deren Verhalten nicht in allen wesentlichen Punkten — sei es, daß die Indolbildung fehlte oder die Zersetzung von Laktose ohne Gasbildung erfolgte — mit der Coligruppe in Einklang stand, bei gleichzeitigem Wachstum auf Zitratagar dieser Gruppe nicht zugerechnet worden. Derartige Stämme, die durchaus nicht selten zu sein scheinen, sind meines Erachtens als Stämme der Paracoligruppe zu betrachten, die unter den Angehörigen dieser Gruppe dem Colibakterium am nächsten stehen.

Außer der Zitronensäure sind unter den organischen Fettsäuren nur noch Propionsäure und Harnsäure beachtenswert; die erstere wird als C-Bestandteil synthetischer Nährmedien nur von Bact. coli, die letztere als N-Quelle nur von Bact. lactis aerogenes verwertet. Mit Bact. acidi lactici sind noch keine Versuche dieser Art angestellt worden. Nach seiner engen Beziehung zur Coligruppe läßt sich aber eine Ausnutzung der Propionsäure und eine Resistenz der Harnsäure als sehr wahrscheinlich voraussagen.

Vergleicht man die sonstigen kulturellen und biologischen Eigenschaften von Bact. acidi lactici und Bact. coli, so ist eine vollständige Übereinstimmung der grundlegenden Merkmale beider Bakterien nicht von der Hand zu weisen. Die Abweichungen, die hinsichtlich der Vergärung einiger Zuckerarten bestehen, sind auch unter den einzelnen Coliarten vorhanden. Die Coligruppe existiert in einer so großen Zahl von Spielarten, daß eine ganze Reihe vorherrschend biologischer Fähigkeiten nur immer einem Teile der Angehörigen dieser Gruppe zukommt. Saprophytische Lebensweise erfordert weitgehende Anpassung an gegebene Verhältnisse; und das Colibakterium kommt diesen Anforderungen in hohem Maße nach, wie einmal die außergewöhnliche Mannigfaltigkeit an Varietäten, die durch Auffindung neuer Unterarten beliebig vermehrt werden könnte, zum anderen die Veränderlichkeit einzelner Merkmale, besonders das Auftreten nicht vorhandenen Gärvermögens beweisen. Die Vielseitigkeit des Bact. coli bringt es mit sich, daß eine Anzahl seiner Fähigkeiten nur eine bedingte Gültigkeit haben. Diese sog. „fakultativen" Eigenschaften, zu denen Beweglichkeit, Indolbildung, Hämolyse, Vergärung einer Reihe von Kohlenstoffverbindungen, wie Saccharose, Raffinose, Sorbose, l-Rhamnose, Dulzit, Adonit, Salizin u. a. gehören, lassen die vielfältigsten Kombinationsmöglichkeiten zu.

Wie allen anderen Colitypen, so ist auch dem Bact. acidi lactici innerhalb der Coligruppe dadurch eine Grenze gezogen, daß einige der fakultativen Eigenschaften der Coligruppe ihren variablen Charakter verloren haben und für dieses Bakterium zu unbedingt feststehenden Merkmalen geworden sind. Der Mikroorganismus, den Hueppe mit dem Namen „Bact. acidi lactici" ausgezeichnet hat, ist unbeweglich. Die ihm sonst völlig gleichen, aber beweglichen Stämme können nicht ebenso benannt werden. Weiterhin besteht für das Milchsäurebakterium auch in bezug auf Indolbildung, Spaltbarkeit der L-Rhamnose und Unzerlegbarkeit von Saccharose und Dulzit vorläufig noch Konstanz, wie vor allem die jüngeren Forscher auf Grund ihrer Differenzierungsverfahren übereinstimmend festgestellt haben.

Wenn man von den Ergebnissen Acklins mit seinem Spezialnährboden absieht, sind indolnegative Stämme noch nicht beobachtet worden; ihr Vorhandensein ist aber mit Sicherheit anzunehmen, da unter den Angehörigen der Coligruppe etwa 10% kein Indol zu erzeugen vermögen. Damit könnte aus diesem konstanten ein fakultatives Charakteristikum werden.

Zur Unterscheidung von Colitypen sind Saccharose und Dulcit die gebräuchlichsten Mittel. Bact. acidi lactici ist, wie schon erwähnt, nicht befähigt, beide Substanzen zu verbrauchen; ein Saccharose vergärender Stamm, auch wenn er sich gegenüber Dulzit negativ verhalten würde, kann nicht als Milchsäurebakterium angesehen werden. Es ist aber bemerkenswert, daß auch Bact. acidi lactici Kohlehydraten, die es normalerweise als C-Quelle ablehnt, unter besonderen Bedingungen ange-

paßt werden kann, oder, um mit Burri zu reden, in beschränktem Maße „umstimmbar" ist. Es gelang z. B. T. W. Twort, durch dauerndes Fortzüchten eines Saccharose nicht vergärenden Milchsäurebakteriums auf saccharosehaltigen Medien zur Spaltung dieses Zuckers zu bringen. Es besteht hier Parallelität zu dem von Burri entdeckten Saccharose nicht vergärenden Bact. coli imperfectum und dem Bact. coli mutabile von Neisser und Massini (35).

Auch dem Bact. acidi lactici kommt die der Coligruppe in so besonderem Maße eigene Veränderlichkeit gewisser Eigenschaften zu, die als „fakultativ" zu bewerten sind. Sie besteht bereits für die hämolytische Wirksamkeit und die Spaltbarkeit von Adonit, Salizin, β-Methylgalaktosid und, nicht ganz so ausgeprägt, auch für α-Methylgalaktosid und β-Methylglukosid. Denn außer den nicht hämolysierenden sind auch hämolysierende, neben Adonit, Salizin und erwähnte methylierte Zucker spaltenden auch diese nicht vergärende Stämme bekannt. Damit sind die fakultativen Merkmale dieses Bakteriums sicherlich noch nicht erschöpft.

Auch in bezug auf die Gärprodukte verläuft der Abbau von Zuckerarten und Alkoholen durch Bact. acidi lactici ganz im Sinne der Coligruppe. Denn Volumen und Bestandteile der Gärungsgase, Säuremenge und Säuregrad der Nährlösung korrespondieren miteinander, wenn die Vergärung von Glukose unter gleichartigen Verhältnissen erfolgt. Erst bei Versuchen im großen macht sich eine durchschnittlich etwas höhere Milchsäureproduktion der Acidi lactici-Kulturen bemerkbar. Man darf daher erwarten, daß einerseits die noch nicht isolierten Gärungsprodukte, wie Ameisensäure und Essigsäure, unter gewissen Voraussetzungen auch Propionsäure, Bernsteinsäure u. a., einander entsprechen, und daß anderseits unter wechselnden Versuchsbedingungen dieselbe Zuckerart auf verschiedene, aber dem Bact. coli gleiche Weise spaltbar ist (Baumgärtel [2], Rippel [43]).

Eine Sonderstellung des Bact. acidi lactici könnte man nach seinem Wachstum auf Gaßner- und Levine-Agar vermuten, da es auf beiden Nährböden zur Schleimbildung neigt. Der letztere wird daher von Hees und Tropp als einziges Mittel zur Unterscheidung von Coli- und Acidi lactici-Stämmen angesehen und empfohlen. Die Schleimbildung könnte dem Milchsäurebakterium die Rolle eines Zwischengliedes zwischen Coli und Lactis aerogenes zuweisen und einen gewissenhaften Systematiker zur Aufstellung einer selbständigen Bakteriengruppe verleiten. Eine derartige Eingliederung von Bact. acidi lactici kann aus mehreren Gründen nicht gerechtfertigt erscheinen. Wie aus den oben mitgeteilten Ergebnissen hervorgeht, trifft dieses eigenartige Verhalten auf Levine-Agar erstens nicht einheitlich für alle Stämme zu, da einige nach Form und Größe ihrer Kolonien mit Coli übereinstimmen oder zu diesem überleiten. Zum anderen kann die Schleimbildung als einziges Unterscheidungsmerkmal nicht als grundlegende Eigenschaft einer Bakterienart dienen, wenn sie nur in besonderen Fällen eintritt; denn auf den gebräuchlichen festen Farbstoffnährböden ruft Bact. acidi lactici keineswegs eine merkliche oder auffallende Schleimbildung hervor.

Nur bei dem aus Wasser gezüchteten St. 7 gestaltete sich die Beurteilung insofern schwieriger, als dieser infolge seiner dicken und schleimigen Wuchsform auf allen festen Nährböden aus dem Rahmen fiel und große Ähnlichkeit mit Lactis aerogenes-Kulturen zeigte. Die sonstigen

Eigenschaften, besonders das negative Verhalten gegenüber Saccharose, Inosit und Natriumzitrat verweisen ihn in die Acidi lactici-Gruppe. Immerhin besteht in diesem Ausnahmefall schon eher eine gewisse Berechtigung, wenn dieser regelwidrige Repräsentant der Coli-Gruppe im weiteren Sinne als zur Lactis aerogenes-Gruppe überleitendes Bindeglied angesehen wird. Derartige Ausnahmen sind nichts Außergewöhnliches.

Nach den experimentellen Daten und den aus ihnen sich ergebenden Folgerungen ist die Aufstellung einer selbständigen Bakteriengruppe unter dem Namen Bact. acidi lactici, die eine Lücke zwischen Coli und Aerogenes auszufüllen hätte, in keiner Weise berechtigt. Das Hueppesche Milchsäurebakterium ist in die Coligruppe einzureihen und als eine der vielgestaltigen Unterarten dieser Gruppe zu betrachten. Maulhard gebührt das Verdienst, als erster diesen Standpunkt vertreten zu haben. Aus historischen wie praktischen Gründen könnte man den Namen Bact. acidi lactici (Hueppe) für den hier behandelten Colitypus beibehalten; er wäre aber nur unter dem Hinweis auf seine systematische Zugehörigkeit zur Coligruppe zu gebrauchen.

Bei Ausführung der vorliegenden Arbeit wurde mehr Wert auf Vielseitigkeit der Methodik als auf umfangreiches Kulturenmaterial gelegt.

Zusammenfassung.

Um die Stellung des Bact. acidi lactici zur Coli- und Aerogenes-Gruppe eindeutig festzulegen, wurde mit einer Anzahl von Stämmen der drei Bakterienarten eine vergleichende Untersuchung an einer Reihe kultureller und biologischer Differenzierungsmethoden vorgenommen.

Aus selbstgezüchteten Reinkulturen verschiedener Herkunft wurden 7 Acidi lactici-, 7 Lactis aerogenes- und 26 Colistämme, unter diesen Angehörige zahlreicher Typen, ausgewählt und einer Prüfung auf Beweglichkeit, Indolbildung, Wachstum auf Endo, Gaßner-Levine- und Pesch-Agar (Natriumzitrat-Ammoniumchlorid-Agar), auf Vergärung von Saccharose, Raffinose, Dulzit, Inosit, Dextrin, Stärke und Inulin und auf ihr Verhalten bei der Methylrotprobe, der Voges-Proskauerschen Reaktion, im polytropen Nährboden nach Lange, und in der biologischen Reihe unterzogen. Das Ergebnis der Untersuchung war folgendes:

Die Kohlehydrate Saccharose, Raffinose, Dextrin, Stärke und Inulin und die Alkohole Dulcit und Inosit werden von Bact. acidi lactici nicht vergoren.

Auf synthetischem Nährboden, wie dem Zitrat-Ammonchlorid-Agar nach Pesch, ist Bact. acidi lactici zum Unterschied von Bact. lactis aerogenes nicht zum Wachstum befähigt.

In Trypsinpeptonwasser wird stets Indol gebildet.

Neben diesen Eigenschaften ist Bact. acidi lactici durch Unbeweglichkeit charakterisiert. Die makroskopische Beweglichkeitsprüfung mit dem halbfesten Agar nach Oldekop stimmt nicht in allen Fällen mit dem Befund im hängenden Tropfen überein.

Im Nährboden nach Clark und Lubs fällt mit Bact. acidi lactici wie bei Bact. coli die Methylrotprobe positiv, die Voges-Proskauersche Reaktion negativ aus.

Im polytropen Nährboden nach Lange und im biologischen Reihenversuch sind Unterschiede zwischen dem Milchäsurebakterium und Bact.

coli nicht wahrnehmbar, während Bact. lactis aerogenes in den meisten Fällen durch stärkere Gasbildung ausgezeichnet ist.

Nicht einheitlich, aber von Coli und Aerogenes immerhin verschieden ist das Wachstum des Bact. acidi lactici auf Gaßner- und Levine-Agar. Auf beiden Nährböden wird der größere Teil der Stämme zu einer erheblichen Schleimbildung angeregt, während ein kleinerer Teil in seiner Wuchsform sich dem eigentlichen Colitypus nähert. Die Schleimbildung als einziges, aber keineswegs eindeutiges Unterscheidungsmerkmal ist aber als Charakteristikum für eine selbständige Bakterienart, die zwischen Coli- und Aerogenes-Gruppe einzureihen wäre, nicht als ausreichend anzusehen.

Auf Grund seiner Eigenschaften ist das Hueppesche Milchsäurebakterium daher als eine Spielart der Coligruppe zu betrachten.

Die für die Versuche verwendeten Colistämme schließen auch 2 unter den Darmbakterien anscheinend sehr seltene Colivarianten ein. Der eine Stamm (21) zeigte ein Spaltungsvermögen für Saccharose und Raffinose, nicht aber für Dulzit. Ähnliche Stämme sind bisher nur von C. O. Jensen als pathogene Formen der Kälberruhr beobachtet worden. Bei dem anderen, bisher nicht bekannten Stamm (33) handelt es sich um einen Dulzit und Raffinose zerlegenden Mikroorganismus, der Saccharose unvergoren ließ. Die Spaltung der Raffinose kann daher nicht in der bei Colibakterien üblichen, der Saccharose analogen Form in Fruktose und Melibiose hydrolysiert worden sein. Es liegt die Vermutung nahe, daß aus dem Molekül des Trisaccharides Galaktose abgespalten und assimiliert worden ist.

Literatur.

1. Acklin, O., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 114. 1929. S. 119. — 2. Baumgartel, T., Grundriß der theoretischen Bakteriologie. 1924. — 3. Bonalberti, E., Boll. Inst. sieroter. milan. Vol. 9. 1930. p. 545. — 4. Buchholz, W., Ztschr. f. Hyg. Bd. 56. 1907. S. 220. — 5. Burk, A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 45. 1907. S. 577. — 6. Braun, H., zit. nach Pesch, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 111. 1929. S. 171. — 7. Burri, R., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 54. 1910. S. 210. — 8. Burri, R., und Duggeli, M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909. S. 145. — 9. Clark, W. M. und Lubs, H. A., Zentralbl f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 64. 1916. S. 410. — 10. Mac Conkey, A., Journ. of Hyg. Vol. 8. 1908. p. 322; Vol. 9. 1909. p. 86. — 11. Conradi, H. und Bierast, W., Handb. d. pathol. Mikroorg. (Kolle-Wassermann.) 2. Aufl. Bd. 6. 1913. S. 482. — 12. Durham, zit. nach Mac Conkey, Journ. inf. Dis. 1905. p. 342. — 13. Escherich, Th., Münch. med. Wochenschr. 1886. S. 43. — 14. Fabry, P., Compt. Rend. Soc. Biol. 1922. p. 87. — 15. Frieber, W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 87. 1922. S. 254. — 16. Frieber, W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Orig. Bd. 36. 1913. S. 438. — 17. Graaff, W. de, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 49. 1909. S. 175. — 18. Gruber, M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Orig. Bd. 16. 1906. S. 654. — 19. Hees, H. und Tropp, C., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 100. 1926. S. 273. — 20. Hueppe, Kaiserl. Gesundh.-Bl. II. 1884. — 21. Jensen, C. O., Handb. d. pathol. Mikroorg. 2. Aufl. Bd. 6. 1913. S. 121. — 22. Kligler, I. J., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 61. 1914. S. 549. — 23. Koser, St. A., Journ. of Bact. Vol. 8. 1923. p. 493; Vol. 9. 1924. p. 59. Vol. 11. 1926. p. 77 and 409. — 24. Kodama, H. und Takeda, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 88. 1922. — 25. Kozai, Y., Ztschr. f. Hyg. Bd. 31. 1899. S. 337; Bd. 38. 1901. S. 386. — 26. Kruse, W., Allgem. Mikrobiol. Leipzig 1910. — 27. Lange, L. und Haendel, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 110. 1929. S. 3. — 28. Laux, Inaugur.-Diss. Frankfurt 1922. — 29. Lehmann, K. B. und Neumann, zit. nach Nißle, Handb. d. pathol. Mikroorg. 3. Aufl. Bd. 6, I. 1929. S. 391 und 414. — 30. Leiter, L. W., Americ. Journ. of Hyg. Vol. 9. 1929. p. 705. — 31. Levine, zit.

nach Hees und Tropp, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 100. 1926. S. 273. — 32. Maulhard, J., Arch. f. Mikrobiol. I. 1930. S. 165. — 33. Minkewitsch, I. E., Trofimuk, N. A. und Wedenjapin, S. A., Ztschr. f. Hyg. Bd. 109. 1929. S. 348. — 34. Minkewitsch, I. E. und Rogosin, I. J., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 124. 1932. S. 159. — 35. Neisser, M., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Ref. Bd. 38. 1906 (Tagesbericht). — 36. Nißle, A., Handb. d. pathol. Mikroorg. (Kolle-Wassermann). 3. Aufl. Bd. 6, I. 1929. S. 391 und 414. — 37. Oldekop, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 35. 1904. S. 123. — 38. Pesch, K. L., Ges.-Ing. Bd. 52. 1929. S. 1. — 39. Pesch, K. L., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 86. 1921. S. 97; Bd. 111. 1929. S. 171. — 40. Pfaundler, M., zit. nach Nißle, Handb. d. pathol. Mikroorg. (Kolle-Wassermann). 3. Aufl. Bd 6. I. 1929. — 41. Reichenbach, zit. nach Maulhard, Arch. f. Mikrobiol. I. 1930. — 42. Rhein, Biochem. Ztschr. Bd. 84. 1917. — 43. Rippel, A., Vorlesungen über theoretische Mikrobiologie. Berlin 1927. — 44. Rubner, M., Arch. f. Hyg. Bd. 19. 1893. S. 136. — 45. Segin, A., Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 34. 1903. S. 202. — 46. Simmons, zit. nach Minkewitsch, Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 124. 1932. S. 159. — 47. Stagnitta-Balistreri, Arch. f. Hyg. Bd. 16. 1893. S. 10. — 48. Twort, F. W., Proc. of the roy. soc. of London. Ser. B. Vol. 79. 1907. p. 329. — 49. Voges-Proskauer, zit. nach Minkewitsch, Ztschr. f. Hyg. Bd. 109. 1929. S. 348. — 50. Wilde, M., Inaug.-Diss. Bonn 1896.

Nachdruck verboten.

The Chemistry of Mold Tissue. VIII. Innate Factors Influencing Growth and Sterol Production of Aspergillus fischeri[1].

[From the Departments of Agricultural Bacteriology and Agricultural Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.]

By **P. R. Wenck, W. H. Peterson** and **H. C. Greene.**

In a study of the sterol content of molds, Pruess et al (1) observed that the production of sterols depended largely upon the species of the mold, the glucose concentration in the medium and the period of incubation. Pontillon (2) reported that the sterol content of A. niger was influenced by the type of nitrogen source in the medium. Similar reports have been made about the sterol content of yeast. Thus according to Bills and associates (3, 4) the percentage of sterol in yeast depends upon the species, the strain of the species and the type of carbohydrate in the medium. Bennett (5) patented a method in which he increased the sterol content of yeast by use of a medium low in nitrogen and containing an oxygen carrier such as methylene blue. Halden et al (6) increased sterol production by passing alcohol vapors over the medium.

On the basis of a previous survey of sterol production by various species of molds [Pruess et al (7)], Aspergillus fischeri, Wehmer, was selected for a study of the influence of various factors upon its growth and sterol production. These factors have been divided into groups: 1. innate; 2. cultural; and 3. environmental factors. In this paper the innate factors will be discussed.

[1]) This work was supported in part by a grant from the Wisconsin Alumni Research Foundation.

Experimental.

Cultures and Medium. Throughout this study either different strains of *Aspergillus fischeri* or single spore cultures of this mold were used. Unless otherwise stated, the mold was grown on the following medium: 10 gm. NH_4NO_3; 6.8 gm. KH_2PO_4; 4.9 gm. $MgSO_4 . 7 H_2O$; 5.0 cc. 1% $ZnSO_4$ solution; 1.0 cc. molal $FeCl_3$ solution; 100 gm. glucose and 10 gm. calcium carbonate made up to 1000 cc. with distilled water. This medium will be referred to as the regular inorganic medium.

The cultures were grown in quintuplicate in 500 cc. Erlenmeyer-flasks, containing 100 cc. of medium at 30° C. for ten days. They were then autoclaved for 10 minutes at 110° C. and 15 lbs. pressure. After cooling, the mycelial pads were washed under running water and dried in a 37° C. incubator for 2 days.

Analytical Methods. Sugar determinations were made on the medium according to the Shaffer-Hartmann method (9).

Sterol was determined by a colorimetric method based on the Liebermann-Burchard reaction. From 1—2 gm. of the dried, ground mycelium was extracted for 3 hours in a Caldwell extractor with 65 cc. of 95 per cent ethyl alcohol. The extract was refluxed for 20 minutes with 5 cc. of 25 per cent potassium hydroxide solution, diluted with 100 cc. of water and the sterol was extracted with two 50 cc. portions of ethyl ether. After washing the combined ether extracts, once with 1% potassium hyroxide and twice with 25 cc. of water, the ether was evaporated on a water bath and the residue dried in a vacuum oven at 50° C. The residue was taken up in chloroform and made up to a volume of 50 cc. To 5 cc. of the chloroform solution in a test tube 2.0 cc. of acetic anhydride and 0.12 cc. of concentrated sulphuric acid were added, the mixture was well shaken and allowed to stand 10 minutes to develop the maximum blue-green color. The colored solution was transferred to a colorimeter and compared with a standard sterol solution in which the color had been developed simultaneously with that in the unknown. If the readings of the standard and the unknown differed by more than 50 per cent, one or the other of the untreated solutions was suitably diluted with chloroform, and the color development and readings of both standard and unknown were repeated.

As a direct standard, a chloroform solution of the unsaponifiable fraction from a large sample of mycelium, diluted so as to contain 0.2 mg. of sterol per cc. served better than a chloroform solution of ergosterol itself. Such a solution remains unchanged for a long time whereas pure ergosterol solutions become more or less yellow within a short time. It also has the advantage of compensating for the slight amount of color present in the chloroform extract of the unknown before the reagents are added. It was standardized from time to time and its stability checked against a freshly prepared chloroform solution of carefully purified ergosterol. The method was checked by addition of known quantities of ergosterol to the ground mycelium. Recoveries ranged from 94 to 106 per cent.

Results with Various Stock Cultures. Six strains of *A. fischeri* were grown on 1. the regular inorganic medium and 2. an organic medium, containing 5 per cent malt sprouts and 10 per cent cerelose. The data, Table 1, show that the strains varied considerably among themselves in respect both to growth and to sterol production. On the organic me-

dium the best yields of mycelium and of sterol were obtained with Strains 4188.21 and 5100; and the poorest ones with 4651.2. On the inorganic medium, however, Strain 4651.2 was one of the best cultures. The average yield, both of mycelium and of sterol, was greater on the inorganic than on the organic medium.

Table 1. Growth and Sterol Production of Various Stock Cultures.

Culture	Organic Medium			Inorganic Medium		
	Mycelium per 100 cc. medium gm.	Sterol %	Sterol per 100 cc. medium mg.	Mycelium per 100 cc. medium[1]) gm.	Sterol %	Sterol per 100 cc. medium mg.
4138 H 52	2.16	0.70	15.3	2.35	0.69	16.2
4188.21	3.34	0.66	22.0	2.44	1.04	25.4
4651.2	1.86	0.65	12.9	3.02	0.66	19.9
5041	2.21	0.68	15.0	3.07	0.81	24.9
5047	2.58	0.58	14.9	2.86	0.77	22.0
5100	3.23	0.81	26.9	3.37	0.87	29.3
Average	2.56	0.68	17.4	2.85	0.81	23.1

1) At time of harvest all sugar had been fermented.

Results with Single Spore Cultures. Cultures that had been obtained from single spores isolated from Strain 5041 of A. fischeri differed markedly in their morphological characteristics [Greene (8)]. Such cultures were grown on the regular inorganic medium and were found to differ considerably in growth and sterol production. The detailed data will not be given but the main facts can be summarized as follows: The weights of mycelium per 100 cc. of medium ranged from 2.26 to 3.37 gm. and the percentage of sterol in the pad varied from .94 to 1.38. On the basis of total amount of sterol produced, SSC 13 was the best and SSC 7 the poorest culture; the latter yielded only 56 per cent as much sterol as the former.

Obviously it would be unwarranted to assume, on the basis of a single trial, that one culture was superior or inferior to the others. Therefore the series of fermentations were repeated six times with eight single spore cultures and the parent culture 5041.

In order to eliminate as far as possible other variables, the media for all six series were prepared from one stock of chemicals and the inoculum for each culture was taken from a large stock soil culture prepared in advance as follows: 200 gm. portions of good garden soil containing 15—20 per cent of moisture were placed in 500 cc. Erlenmeyer flasks and autoclaved for 3 hours on three successive days. Each flask was then inoculated with a heavy spore suspension of one of the cultures taken from an agar slant. The flasks were incubated at 28° C., were kept at that temperature during the whole experiment, and were used from time to time as the source of the inoculum for all subsequent fermentations.

At approximately monthly intervals, a series of fermentations in the regular inorganic medium were conducted. In all, six series with nine cultures in each series or fifty-four tests, each of which comprised five replicate flasks, were made. The minimum, maximum and average results for each culture in the six fermentations are given in Table 2.

Table 2. Growth and Sterol Production of the Single Spore Cultures and the Parent Culture A. fischeri, Strain 5041.

Culture	Mycelium per 100 cc. Medium			Sterol			Sterol produced per 100 cc. Medium		
	Minimum gm.	Maximum gm.	Average gm.	Minimum %	Maximum %	Average %	Minimum mg	Maximum mg.	Average mg.
SSC 1	2.65	2.92	2.76	.97	1.21	1.10	27 2	32.2	30.4
2	2 74	3.09	2.86	.73	1.22	.95	22 5	33.8	27.0
7	2.75	3.07	2.94	.94	1.14	1.07	28 8	33.2	31.5
9	2.27	2.49	2.38	1.15	1.47	1.27	27.8	33.4	30.1
10	2.57	2.96	2.75	1.12	1.29	1.20	30.7	37.6	33.1
12	2.35	2.64	2.54	.95	1.48	1.14	24.0	34.8	28.8
13	2.93	3.22	3.10	.93	1.16	1.02	27.8	34.4	31.7
20	2.53	3.28	2.86	.73	.97	.84	19.6	26.4	23.9
Average of SSC	2.60	2.96	2.77	.94	1 24	1.07	26.1	33.2	29 6
Parent . . .	2 25	3.27	2.61	.83	1 13	.96	20.8	28.1	25 2

In all series good growth was obtained from all soil cultures. Except for SSC 20, the weights of pad obtained for each single spore culture changed very little from series to series. If for a given culture, weights for all the six series are averaged and the largest deviation from that average is expressed in terms of percentage, a value is obtained which might be called the "limit of experimental variation". This value, together with the average yield was useful in selecting a culture for mycelium and sterol production. It is interesting to note the large differences between maximum variations of the single spore cultures, except SSC 20, and that of the parent culture. The values for the former averaged 7.5, and the value for the latter was 25.2 per cent.

The variation of the percentage of sterol was much greater than that of mycelial growth. There was, however, no definite trend towards an increase or decrease of the percentage in any one culture. The departure from the average was as high as 29 per cent for SSC 12 and only 7.1 per cent for SSC 10.

Naturally with the weight of mycelium and the percentage of sterol varying from series to series, the total amount of sterol produced per unit volume of medium (100 cc.) varied also from series to series. Depending on whether the variations of the first two ran parallel or opposite, the variation of the quantity of sterol produced was either accentuated or minimized. These variations ranged from 8.6 to 25.2 per cent for the single spore cultures and averaged 14.9 per cent. The variation for the parent culture was 17.5 per cent. As with weight of mycelium and percentage of sterol there was again no apparent trend in the variations observed.

According to the weight of mycelium produced, the SSC cultures in each series have been numbered 1—8, 1 being that giving the best results, 2 the next best, etc. With the exception of SSC 20, the order of the single spore cultures changed very little from series to series. SSC 13 produced the largest weight of mycelium in four out of six tests and SSC 9 always the smallest; whereas SSC 12 took always the seventh place. The other spore cultures changed within 2 or 3 places, except SSC 20 which was the least consistent of them all, holding the first place twice, and the third, fourth,

fifth and sixth places once each. In comparison with the single spore cultures, the parent culture ranked among the last three.

When arranged according to their percentage of sterol all the cultures held about the same position from series to series. Excepting in one trial, SSC 9 held consistently the first place with an average for all series of 1.29 per cent, and SSC 20 held without exception the last place with an average of 0.86 per cent. The intermediates varied somewhat more, but the extremes were very constant. It appears, therefore, that the ability to produce sterol is partly an innate character of a culture similar to that of capacity for growth.

The arrangement of single spore cultures according to the amount of sterol produced per 100 cc. of medium is not as constant from series to series as that for weight of mycelium or percentage of sterol. This is mostly due to the fact that two variables, mycelium production and sterol percentage, enter into play. Nevertheless the data allow rating of the cultures and selection of the good and poor sterol producers. The best three cultures were SSC 10, which ranked first three times and second twice, and SSC 13 and SSC 7. The poorest cultures were SSC 20, which gave always the lowest yield in sterol, and SSC 2.

The relationships of these cultures in respect to production of mycelium and of sterol are brought out more clearly by the numerical order given in Table 3. Here the single spore cultures have been arranged according to their average results in the respective determinations for all six series. From this table it appears evident that there exists an inverse relationship between mycelium-formation and sterol percentage; cultures which yield the best weights of mycelium rank low in the percentage of sterol and vice versa. This inverse relationship between the amount of mycelium formed and the percentage of sterol produced has been frequently observed also in other experiments. Just how the two properties are linked is difficult to say.

Table 3. Arrangement of the Single Spore Cultures According to Their Goodness.

Place No.	Weight of mycelium	Percentage of sterol	Weight of sterol
1	SSC 13	SSC 9	SSC 10
2	7	10	13
3	2	12	7
4	20	1	1
5	1	7	9
6	10	13	12
7	12	2	2
8	9	20	20

Effect of Associated Growth of Single Spore Cultures. After having grown and studied single spore cultures separately, the question arose as to what the effect would be if two cultures were grown together. The following experiment was set up:

Flasks containing the regular inorganic medium were divided into two groups. Each flask of group I was inoculated with one single spore culture whereas each flask of group II was inoculated with two single spore cultures. To obviate any difference in the size of the inoculum, the flasks of group I were inoculated twice with the same cultures. Table 4 gives the results.

In growing two single spore cultures together, the resulting yields always resembled those of the poorer of the two cultures. Any advantage of a good single spore culture was entirely suppressed by the presence of the poor one. This held true for growth, for percentage of sterol and for yield of sterol.

Table 4. Growth and Sterol Production of Single Spore Cultures Grown Singly and Combined.

Culture	Mycelium per 100 cc. medium gm.	Sterol in pad %	Sterol per 100 cc. medium mg.
SSC 9	2.42	1.15	27.8
SSC 13	3.14	1.06	33.3
SSC's 9 + 13	2.46	1.02	25.1
SSC 2	3.08	.73	22.5
SSC 9	2.42	1.15	27.8
SS's 2 + 9	2.38	.98	23.3
SSC 10	2.71	1.12	30.4
SSC 13	3.14	1.06	33.3
SSC's 10 + 13	2.76	1.08	29.8
SSC 12	2.62	.98	25.9
SSC 20	2.74	.73	19.6
SSC's 12 + 20	2.84	.73	20.5
SSC 1	2.81	1.02	28.6
SSC 20	2.74	.73	19.6
SSC's 1 + 20	2.61	.89	23.3
SSC 13	3.14	1.06	33.3
Parent Culture	2.55	.83	20.8
SSC 13 + parent culture	2.81	1.09	30.6
SSC 20	2.74	.73	19.6
Parent culture	2.55	.83	20.8
SSC 20 + parent culture	2.84	.65	18.4

Age of Soil Inoculum. The soil cultures just discussed were kept in the 28° C. incubator and used twice as inocula upon the regular inorganic medium at the age of 11 months and 18 months. The results were almost identical with those obtained when the soil inocula were young.

Summary.

The growth and sterol production of six strains of Aspergillus fischeri, Wehmer, and eight single spore cultures from one strain of the same mold have been studied under identical conditions. It was found that both growth and sterol production varied with the strain and with different single spore cultures. In repeated trials the results were as follows: maximum variations averaged 7.5 per cent for growth and 14.9 per cent for sterol production when single spore cultures were used as inoculum, and 25.2 per cent and 17.5 per cent respectively when the parent culture was used.

References.

1. Pruess, L. M., Peterson, W. H., Steenbock, H., and Fred, E. B., J. Biol. Chem. Vol. 90. 1931. p. 369. — 2. Pontillon, C., Compt. rend. T. 191. 1930. p. 1367. — 3. Bills, C. E., Massengale, O. N., and Prickett, P. S., J. Biol. Chem. Vol. 87. 1930. p. 259. — 4. Massengale, O. N., Bills, C. E., and Prickett, P. S., J. Biol. Chem. Vol. 94. 1931/32. p. 213. — 5. Bennett, Wm. G., with the International Yeast Co., Ltd., Brit. Pat. 396,206, Aug. 3. 1933. — 6. Halden, W., Bilgen, F., and Kunze, R., Naturwissenschaften. Bd. 36. 1933. S. 660. — 7. Pruess, L. M., Gorcica, H. J., Greene, H. C., and Peterson, W. H., Biochem. Z. Bd. 246. 1932. S. 401. — 8. Greene, H. C., Mycologia. Vol. 25. 1933. p. 117. — 9. Shaffer, P. A., and Hartmann, A. F., J. Biol. Chem. Vol. 45. 1920/21. p. 365.

Nachdruck verboten.

The Chemistry of Mold Tissue.
IX. Cultural Factors Influencing Growth and Sterol Production of Aspergillus fischeri[1].

[From the Departments of Agricultural Bacteriology and Agricultural Chemistry, University of Wisconsin, Madison, Wisconsin.]

By **P. R. Wenck, W. H. Peterson** and **E. B. Fred.**

With 1 figure in the text.

Introduction.

In a previous publication (1) it was reported that the total sterol content of Aspergillus fischeri showed considerable variations due to what may be termed "innate factors"; viz., the strain of the species, or the single spore culture obtained from a particular strain. In this paper other factors which, superimposed upon the innate factors, influence the growth and sterol formation of this mold will be discussed.

Experimental.

Culture and Medium. Unless stated otherwise, heavy spore suspensions from malt agar slants of Single Spore Culture 13 of strain 5041 (Thom) of A. fischeri were used as inoculum. The base medium consisted of 10 g. ammonium nitrate, 6.8 g. monobasic potassium phosphate, 4.9 g. magnesium sulphate, 5.0 cc. of 1% zinc sulfate solution, 1.0 cc. molar ferric chloride solution and 200 g. commercial glucose per liter. The cultures were grown in 500 cc. Erlenmeyer flasks containing 100 cc. of the medium. They were incubated usually at 30° C. for 10—12 days but changes in both medium and environmental conditions were made as indicated in the various experiments. The technique of harvest and of sterol determination were the same as given in the previous paper (1). Unfermented sugar was determined by the Shaffer-Hartmann method (2).

Effect of Various Carbon Sources. The mold (Strain 5041) was grown for 10 days at 30° C. on a medium containing the regular inorganic salt mixture, calcium carbonate and the carbon compound to be

[1]) This work was supported in part by a grant from the Wisconsin Alumni Research Foundation.

investigated (5%). Thirty compounds were used in turn. The mold grew on twenty-four (Table 1). It did not grow, or grew so sparsely that nothing could be harvested on rhamnose, citric acid, oxalic acid, lactic acid, acetic acid and potassium acetate.

Weight of mycelium, percentage of sterol and weight of sterol produced varied considerably with the different carbon sources. The mold grew best on calcium gluconate, starches except potato starch, mannitol, raffinose and glucose. On lactose, melizitose and ethyl alcohol growth was poor. Since A. fischeri grows well on glucose and galactose, it is probable that the inability of the mold to grow on lactose is due to the absence of lactase. There is undoubtedly a trend, though with occasional irregularities, toward a higher yield of mycelium with increasing molecular weight of the carbon source used. This relationship becomes more marked when the amount of mycelium produced is calculated on the basis of 100 g. of carbon fermented (Table 1, column 3). The average weight of mycelium on this basis is 56 g. for pentoses, 70 g. for hexoses, 76 g. for disaccharides and 88 g. for polysaccharides.

Table 1. Growth and Sterol Production on Various Carbon Sources.

Carbon source	Carbon source fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Mycelium per 100 g. carbon fermented g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
Arabinose	4.9	1.24	62	.92	11.4
Xylose	4.9	0.99	50	1.23	12.2
"Cerelose"[1]) . . .	4.5	1.29	68	1.08	13.9
Glucose	5.0	1.40	70	1.04	14.6
Fructose	4.6	1.26	70	1.02	12.9
Galactose	4.2	1.25	73	0.53	6.6
Sucrose	4.7	1.50	75	1.03	15.5
Lactose	0.5	0.32	—	0.42	1.3
Maltose	4.8	1.54	77	0.89	13.7
Melizitose	—	0.60	—	0.73	4.4
Raffinose	4.9	1.62	77	0.82	13.3
Dextrin	4.6	1.59	80	0.90	14.3
Inulin	4.6	1.41	70	1.17	16.5
Cornstarch	4.3	1.65	97	0.69	11.4
Potato starch . .	—	0.93	—	0.69	6.4
Ricestarch	4.3	1.64	97	0.68	11.2
Arrowroot starch .	4.1	1.62	95	0.72	11.7
α methyl glucoside	—	1.01	—	0.66	6.7
Amygdalin . . .	—	1.35	—	0.89	12.0
Salicin	—	1.00	—	1.15	11.5
Pectin	—	1.46	—	0.72	10.5
Calcium gluconate	4.8	1.73	—	0.42	7.3
Mannitol	—	1.62	—	0.68	11.0
Ethyl alcohol . .	5.0	0.50	—	1.30	6.5
Glycerol	—	1.57	—	1.14	17.9

[1]) Trade name for commercial glucose.

The percentage of sterol varied considerably, being highest (1.30%) in the mycelium grown on ethyl alcohol and lowest (0.42%) on calcium gluconate and lactose. It appears to be independent of the chemical nature

of the carbon source except molecular weight; it decreased with increase in the molecular weight of the compound.

An interesting relationship appears to exist between percentage of sterol and what we have termed "efficiency"; i. e., the quantity of mycelium formed per 100 g. of carbon source fermented. As the efficiency increased, the percentage of sterol decreased and vice versa. Because of this inverse relationship, the total amount of sterol produced should be either the same for all samples or at a maximum somewhere between the maxima of the two components. The largest quantities of sterol were obtained in media containing glycerol, inulin or sucrose; none of these media was optimum both for yields of mycelium and percentage of sterol.

Effect of Glucose Concentration. In an experiment with starch it was found that the yields of mycelium and sterol varied with the quantity of carbohydrate available. Therefore an experiment was set up to study the effect of glucose concentration over a wide range (1—70 g. added to 100 cc. salts solution). It was planned to harvest whenever 85% of the sugar had been fermented.

The mold grew well in all concentrations (Table 2, Series A). With increase of glucose concentration the average rate of fermentation increased from 0.21 to 2.45 g. glucose, and the average rate of growth increased from 0.08 to 0.57 g. mycelium per day. The efficiency, on the other hand, dropped from 38 to 23% with increase in glucose concentration.

Table 2. Growth and Sterol Production on Various Glucose Concentrations.

Glucose added per 100 cc. g.	Days of incubation	Glucose fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Mycelium per g. glucose fermented g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
Series A.						
1.0	4	.84	.32	.38	.56	1.8
3.0	5	2.55	.93	.36	.51	4.7
5.0	7	4.65	1.60	.35	.72	11.5
10.0	8	9.50	3.21	.34	.83	26.6
15.0	10	14.38	4.74	.33	.71	33.7
20.0	12	19.2	5.54	.29	.81	44.9
30.0	14	29.0	8.11	.28	.81	65.7
40.0	16	39.4	10.22	.26	.76	77.7
55.0	22	49.3	13.05	.26	.84	110.0
70.0	28	68.6	15.85	.23	.97	154.2
Series B.						
10.0	7	6.8	1.95	.29	1.16	23.0
20.0	7	7.1	2.14	.30	.85	18.0
30.0	7	12.2	3.24	.27	.72	23.0
40.0	7	16.7	4.00	.24	.67	26.0

The percentage of sterol was fairly constant (about 0.78%) except in mycelia grown on very low concentrations (in which it dropped to .51%) or on very high concentrations (in which it rose to .97%). This is in agreement with previous observations that efficiency and sterol percentage vary inversely. However, the total amount of sterol formed per flask increased with glucose concentration, so that in the flask containing 70 g. glucose per 100 cc., 154 mg. sterol were obtained in 28 days as against 27 mg. in 8 days in the flask containing the standard 10% glucose solution.

If instead of allowing the mold to grow until 85 per cent or more of the glucose in the medium was fermented, all the mycelia were harvested at the same time, an entirely different picture was obtained (Table 2, Ser. B). In this case the percentage of sterol decreased (as well as efficiency) from 1.16% with 10% glucose to 0.67% with 40% glucose. As a consequence the yield of sterol per 100 cc. of medium was practically constant. This shows that in the later stages of fermentation the rate of sterol production is greater than that of growth.

Effect of Ammonium Nitrate Concentration. In this experiment the concentration of ammonium nitrate was varied from 0.25 to 20.0 g. per 100 cc. of medium. For production of both mycelium and sterol the optimum concentration was found to be between 1.0 and 2.5 g. per 100 cc. medium (data not given in tables). Either below or above these concentrations both fermentation and growth were retarded. The efficiency of the conversion of glucose to mycelium decreased with increasing ammonium nitrate content of the medium and in a medium containing 20% ammonium nitrate no growth whatever was obtained. Up to 2.0 per cent, the percentage of sterol remained almost constant (0.7%); after that it fell off rapidly so that at 5 per cent only a trace could be detected.

Effect of Nitrogen Source. A study of the growth of sterol production on media containing various nitrogenous compounds was undertaken. The compounds were added in such quantities that each flask contained 350 mg. of nitrogen, the same as was present in the regular inorganic medium. The mold was grown both with and without calcium carbonate. The period of incubation was 12 days.

On media with calcium carbonate (Table 3), ammonium nitrate was the best nitrogen source; on media without calcium carbonate, however, urea surpassed the others. The mold grew poorly on media containing ammonium chloride or ammonium sulfate to which no calcium carbonate had been added. The pads were thin and non-sporulated, while on all other media sporulation took place. In these instances the addition of calcium carbonate improved the yields decidedly as is seen by comparison of the figures for the corresponding samples. The best results were obtained in a medium containing urea but with no calcium carbonate; the addition of calcium carbonate lowered the yields markedly.

Table 3. Growth and Sterol Production on Various Nitrogen Compounds

Compound equivalent to 350 mg. N_2	$CaCO_3$	Glucose fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
NH_4NO_3 . . .	+	16.7	4.96	.92	45.7
$(NH_4)_2SO_4$ . .	+	13.1	4.45	.80	35.6
NH_4Cl	+	10.2	3.31	.76	25.2
$CO(NH_2)_2$ . . .	+	4.5	1.08	.48	5.2
NH_4NO_3 . . .	—	16.9	4.73	.85	40.1
$(NH_4)_2SO_4$ . .	—	9.4	0.71	.77	5.5
NH_4Cl	—	7.2	1.11	.69	7.7
$CO(NH_2)_2$ . . .	—	19.6	5.17	1.05	54.2
$NaNO_3$	—	17.6	4.28	.88	37.6
$Ca(NO_3)_2$ . . .	—	10.9	4.29	.53	22.8

The mycelium obtained on the calcium nitrate medium proved of special interest. It was permeated with calcium salt and its ash content was found to be 16.0%. It appears, therefore, that, as the nitrate was utilized by the mold, calcium was precipitated in the mold mycelium.

It is of special note in this experiment that there was no inverse relationship between growth and sterol percentage; in fact the highest percentage of sterol was associated with the maximum yield of mycelium. The parallelism of the two effects in the case of urea is clearly related to the form of nitrogen employed.

Effect of Neutralization of Medium. In the experiment with various nitrogen sources, results indicated that better yields of both mycelium and sterol were obtained if the medium was kept neutral during the fermentation by the addition of calcium carbonate or by the use of salts that do not render the medium acid upon hydrolysis. It was therefore decided to study the effect of neutralization in more detail.

The mold (Culture 5041) was grown on the regular inorganic medium with 10% cerelose: 1. without calcium carbonate, 2. with calcium carbonate, 3. with various concentrations of potassium acetate, 4. with potassium hydroxide added at intervals to readjust pH of medium to 6.8, 5. with various concentrations of potassium acetate and intermittent addition of potassium hydroxide and 6. with various concentrations of potassium acetate and calcium carbonate.

Examining Table 4, one may conclude that any method counteracting the acidity formed during fermentation increased the production of mycelium and in most cases that of sterol. The use of calcium carbonate alone increased the weight of mycelium, but left the sterol content unaffected. The addition of 1 to 2% potassium acetate increased both weight of mycelium and percentage of sterol and consequently gave the best yield of sterol. Addition of both acetate and carbonate to the same medium brought about the largest yield of mycelium, though for optimum production of sterol addition of potassium acetate alone was sufficient.

Table 4. Growth and Sterol Production on Media Containing Various Neutralizing Agents.

Neutralizing agent	Mycelium per 100 cc. g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
None	1.89	.74	14.0
CaCO3	2.49	.74	18.4
K-acetate 0.25—0.50°₀	2.12	.90	19.1
K-acetate 0.62—1.0%	2.48	.87	21.6
K-acetate 1.25—2.0%	2.47	.90	22.2
KOH added daily to adjust pH to 6.8	2.20	.90	19.8
Same + 0.62% K-acetate	2.28	.88	19.9
Same + 1.25% K-acetate	2.31	.90	20.8
Same + 2.0 % K-acetate	2.27	1.04	23.7
$CaCO_3$ + 0,62% K-acetate	2.88	.73	20.9
$CaCO_3$ + 1.25% K-acetate	2.95	.72	21.4
$CaCO_3$ + 2.0 % K-acetate	2.93	.61	17.8

Effect of Urea and Hydrogen Ion Concentration. Because the results obtained with a medium containing urea and calcium

carbonate did not agree with those obtained in the study of the effects of various neutralizing agents, urea-media were prepared and adjusted to various hydrogen ion concentrations by the addition of either sulfuric acid or potassium hydroxide. In preparing the media, the urea was sterilized separately and added to the sterile inorganic salts-glucose medium just before the addition of sterile sulfuric acid or potassium hydroxide solutions. The concentration of urea was equivalent to 350 mg. nitrogen per 100 cc. The results are given in Table 5. In the medium having an initial pH of 8.0, the mold did not begin to grow until the fourth day, which accounts perhaps for the poor fermentation in this medium. Excepting this case, the efficiency of conversion of glucose to mycelium increased with decreasing initial hydrogen ion concentration, best growth being obtained with initial pH of 6.0.

Table 5. Growth and Sterol Production at Different Initial Hydrogen Ion Concentrations.

Initial pH	Final pH	Sugar fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Mycelium per 100 g. sugar fermented g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
2.0	7.4	20.0	3.98	20	1.98	79
3.0	7.4	20.0	4.34	22	1.93	84
4.6	7.0	20.0	4.47	22	1.67	75
6.0	7.6	20 0	5 50	28	1.10	61
8.0	7 0	13.3	3.60	27	.66	24

The percentage of sterol was unusually high in mycelium grown on acid media, reaching a maximum of 1.98 at initial pH of 2.0. From there it decreased with increasing initial pH, exhibiting again an inverse relationship with the quantity of mycelium produced.

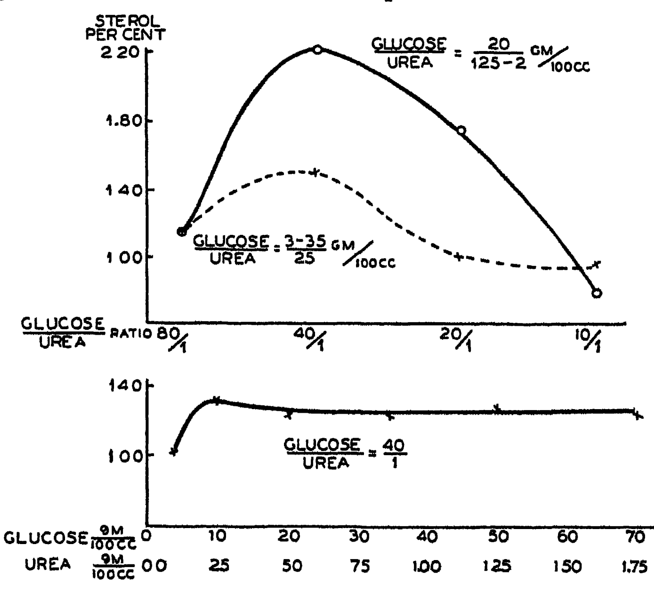


Fig 1. Effect of Varying the Ratio of Glucose to Urea on Sterol Content.

Effect of Glucose-Urea Ratio in Medium. In a further study with urea it was observed that there exists a ratio of glucose to urea which is optimum for high sterol percentage (Figure 1). In the first experiment the concentration of glucose (represented by the upper solid line)

was the same in all the flasks, namely, 20 g. per 100 cc., but the concentration of urea varied from 0.125 to 2.0 g. The highest percentage of sterol was obtained on a medium with a glucose-urea ratio of 40 : 1. In a second experiment the urea concentration was the same in all the flasks, but the glucose content varied from 3.0 to 35.0 g. per 100 cc. As shown by the second curve, the medium containing 10 g. of glucose and 0.25 g. urea yielded the mycelium with the highest sterol percentage, which again is a ratio of 40 : 1.

In a third experiment the concentration of glucose and of urea were varied but the ratio of the two compounds (40 : 1) was the same in all flasks. Except for mycelia grown on the medium of very low concentration, the percentages of sterol were practically the same in all the samples.

Table 6. Effect of Temperature upon Growth and Sterol Production.

Culture No.	Temperature ° C.	Period of incubation days	Mycelium per 100 cc. g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
Stock 5041 . . .	20	14	2.85	0.62	17.7
Stock 5041 . . .	30	10	2.85	0.76	21.7
Stock 5041 . . .	37	10	2.76	1.06	29.3
Stock 5041 . . .	45	20	1.88	1.12	21.1
SSC 1	20	12	2.56	0.74	18.9
SSC 1	30	10	2.53	1.05	26.3
SSC 7	20	12	2.72	0.71	19.3
SSC 7	30	10	2.59	0.98	25.4

Table 7. Effect of Period of Incubation upon Growth and Sterol. Production of A. fischeri.

No. of days grown	Temperature 30° C.				Temperature 37° C.			
	Sugar fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.	Sugar fermented g.	Mycelium per 100 cc. g.	Sterol %	Sterol per 100 cc. mg.
5	8.4	2.88	.82	23.6	9.7	3.10	.72	22.4
10	10.0	2.71	1.00	27.2	10.0	2.72	1.05	28.6
15	10.0	2.33	1.41	32.8	10.0	2.63	1.05	27.6
20	10.0	1.92	1.51	29.0	10.0	2.48	1.54	38.2
25	10.0	1.91	1.76	33.6	10.0	2.27	1.57	35.6
35	10.0	1.87	1.86	34.8	10.0	2.48	1.25	31.0

Effect of Temperature and Period of Incubation. As is seen from Table 6, temperatures studied had no effect upon the amount of mycelium formed except at the highest temperature (45° C.). The percentage of sterol, however, was increased by raising the temperature. For both growth and sterol production incubation at 37° C. yielded maximum results. In a preliminary experiment it had been noted that the percentage of sterol increased steadily as the fermentation proceeded. Table 7 shows the effect with culture 5041 of an incubation extending beyond the period of fermentation. The mycelium began to autolyze and lost weight. Sterol seemed to be somewhat resistent to autolysis; in fact, during the first stages

of autolysis, sterol actually increased. At a temperature of 30° C., the total amount of sterol increased from 27 mg. at the time when all sugar had been fermented to 35 mg. at the end of the experiment. The weight of mycelium fell in the meantime from 2.7 to 1.9 g. per flask. At 37° C., the maximum accumulation of sterol came much earlier; after that sterol was decomposed.

Effect of Air Supply. An earlier experiment had shown a markedly increased percentage of lipids in mold mycelia grown with a limited supply of air. Therefore a similar study was made of the effect of air supply on sterol production by A. fischeri.

Parent culture No. 5041 was used as inoculum on both the regular inorganic salts-glucose medium and a medium containing 5% maltsprout and 10% glucose. Half of the flasks were capped by stretching two layers of tinfoil over the cotton plug and the neck of the flask. The purpose was not to prevent aeration but to restrict it.

The most evident effect of restricted air supply was in the sporulation of the mycelium: the mycelium in the uncapped flasks was always well covered with spores, while that in the capped flasks was sporulated only partially or not at all. The capping slowed down fermentation and growth, but did not affect the weight of mycelium produced per gram of sugar fermented. Capping did, however, reduce the percentage of sterol from .85 to .64% and thereby the yield of sterol.

Next was studied the effect of increasing the air supply by providing the flasks with rubber stoppers and tubing, and passing sterile air constantly, not through the medium, but just over it. At time of harvest it was noted that the mycelium over which air had been passed was covered much more heavily with spores than that in the controls. The determination of unfermented sugar and quantity of mycelium revealed again the fact that the air supply affected the rate of fermentation and growth, but had no effect upon the weight of mycelium produced per gram of sugar fermented (0.24 g.). The increased supply of air had no effect upon the sterol percentage, (0.61%) and therefore the total amount of sterol produced depended upon the rate of growth only.

It appears then that enough oxygen gets through the cotton plugs to bring about maximum percentage of sterol, but that a decrease in this supply of oxygen not only slows down growth and sporulation but also reduces the percentage of sterol.

Summary.

Cultural factors influencing the growth and sterol production of Aspergillus fischeri were studied.

With different carbon sources an inverse relationship between the quantity of mycelium produced and the percentage of sterol in the mycelium was noted. Increasing the glucose concentration in the medium increased the percentage of sterol. In media without calcium carbonate, urea was the best nitrogen source; in media with calcium carbonate, ammonium nitrate was the best nitrogen source. The percentage of sterol varied with the ratio of glucose and urea in the medium; a ratio of 40 : 1 gave the best results. The percentage of sterol increased with temperature of incubation, 37° C. being the best temperature for total yield of sterol. With longer period of incubation, the percentage of sterol increased, even after the mycelium began to autolyze. Restricted or forced aeration of the culture-flasks did

not affect growth or sterol production but caused a corresponding decrease or increase in the rate of fermentation.

The highest percentage of sterol (2,23%) was obtained in a medium with low concentration of urea (0.5%), adjusted to pH 2.0 and incubated at 37° C. This medium gave also the highest yield of sterol (134 mg.) per 100 cc. and the highest yield per gram glucose fermented (6.7 mg.).

Bibliography.

1. Wenck, P. R., Peterson, W. H., and Greene, H. C., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 92. 1935. S. 324—330. — 2. Shaffer, P. A., and Hartmann, A. F., Journ. Biol. Chem. Vol. 45. 1920/21. p. 365.

Nachdruck verboten.

The Relation between Temperature and the Rate of Fermentation of Commercial Sauerkraut.

[New York Agricultural Experiment Station, Geneva, N. Y.]

By **Carl S. Pederson.**

With 3 figures in the text.

As a result of the practice in many kraut factories of opening vats of kraut for canning or shipping in the order in which they were packed, the product has lacked uniformity[1]). The kraut in certain vats has been completely cured and of high quality, while that from other vats packed earlier was still unfermented. Kraut packers have attributed the lack of uniformity to the rate of fermentation. A few packers have noted a relationship to temperature while others have believed that an increased salt content delayed fermentation. The study of the relation between the rate of fermentation of commercial sauerkraut and temperature has been conducted in kraut factories during the past five seasons.

During three seasons the kraut in all vats in plant No. 1 had been tested for acidity every 6 to 10 days during the fall and less frequently during the winter. To standardize conditions so that a uniform kraut could be obtained, the salt content was regulated to 2.4 per cent. A vat was considered completely fermented when acidity of 1.6 per cent acid calculated as lactic acid was attained. Atmospheric temperature records were obtained from weather records at the Experiment Station, and it was assumed that since plant No. 1 was only 4 kilometers from the Station the conditions were practically the same.

Results.

The results in plant No. 1 (Figs. 1, 2, and 3) show that as the atmospheric temperature at the time of packing lowers, the time required for complete fermentation of the kraut increases. For example, in 1929 it re-

[1]) For a historical review and more detailed data, see New York Agric. Exp. Sta. Bull. No. 614. 1932. Approved by Director N. Y. State Agr. Exp. Station for publication as Journal Paper. No. 78.

quired from 14 to 80 days to ferment various tanks of kraut. Seven tanks filled between October 4 to 11 required from 15 to 80 days for the kraut to cure. Of these, the kraut in tanks Nos. 14, 15, 17, and 18 required from 48 to 73 days to ferment, while that in tank No. 16 was completely fermented in only 15 days. Any number of similar irregularities in rate of fermentation were noted. Curiously enough, while in the 1929 season the kraut in tank No. 16 fermented so rapidly and that in tanks Nos. 14 and 15 so slowly, in 1930 the kraut in vat No. 16 required 65 days, while that in tanks Nos. 14 and 15 required only 26 and 18 days, respectively. This shows a lack of relationship between the position of tanks and rate of fermentation.

In 1929 (Fig. 1), the peaks on the temperature curve occur from September 24 to 30, on October 7 and 14, from October 20 to 24, and from November 1 to 4. It may be seen that kraut packed during these peak periods

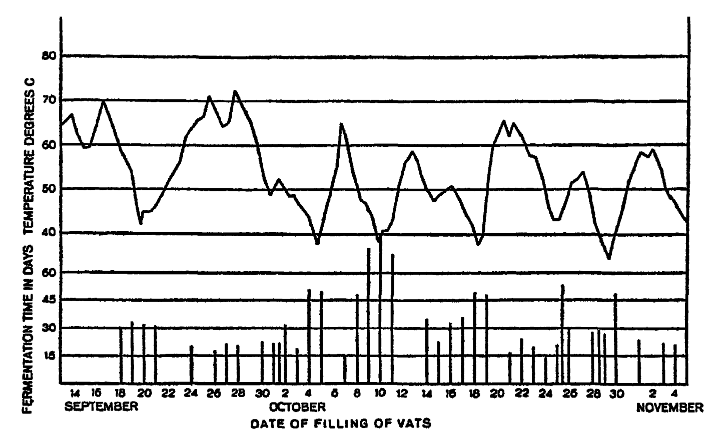


Fig. 1. The Daily Mean Atmospheric Temperature at the Time of Filling Compared with the Rate of Fermentation of Sauerkraut in Vats During 1929.

usually required the least time to ferment, i. e., 14 to 24 days. During the same season the low points in the temperature curve occurred on October 4, 10, 18, 25, and 30. It may be seen that the longest periods required for vats of kraut to ferment (the time varying up to 80 days) were coincident with low temperatures.

In 1930 (Fig. 2), the temperature curve did not fluctuate during the packing season as much as in 1929. There was a uniformly high temperature up to September 28. The longest time required during this period for any vat of kraut to ferment was 32 days. Following this, several days of cold weather occurred, followed by another warm period. The kraut in 2 vats packed during the cold period required 47 and 65 days to cure, while that in the 10 vats packed during the warm period following varied from 15 to 31 days in curing time. A marked drop in temperature occurred on October 19, and from then to the end of the season, even tho the factory was heated, the rate of fermentation of all kraut packed was considerably slower, 65 days being the maximum curing time.

The temperature curve for 1931 (Fig. 3), altho varying considerably, showed an uniformly warm condition thruout the season. The average daily

temperature fell below 45° F. for only a few days, notably on October 18 and after October 30. No kraut was packed following the first cold day. Kraut packed after October 30 required from 36 to 50 days to ferment, the longest time of any kraut packed during the season. The cabbage coming from the fields is at practically the same temperature as the surrounding atmosphere. In the trimming, shredding, and packing processes it naturally warms up somewhat due to the contact with the warm air of the factory, but once in the vat it is much more difficult to warm. The wooden sides and top of the vat are very good insulators, and altho some heat is transmitted to the kraut from a warm room and some rise in temperature results from the fermentation, the temperature of the cabbage as it comes from the field appears to be of greatest significance in determining the temperature in the vat of kraut.

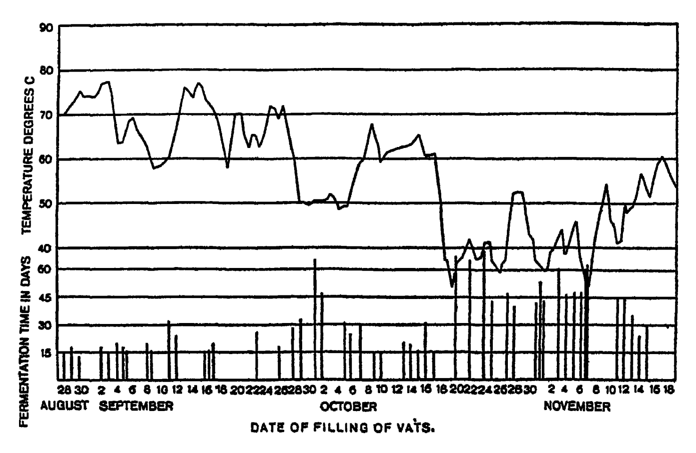


Fig. 2. The Daily Mean Atmospheric Temperature at the Time of Filling Compared with the Rate of Fermentation of Sauerkraut in Vats During 1930.

Graphs were prepared to show the relation of the time of fermentation to the temperature on the day of shredding and to the temperature on the day previous to shredding. There seems to be a better correlation between the average temperature of the day previous to packing and the rate of curing then between the temperature of the day of packing and the rate of curing. However, the time necessary to ferment kraut cannot be accurately predicted from the average daily atmospheric temperature. Possibly if more accurate temperature relationships could be determined, the explanation of deviations from normal would be evident. A few of these deviations may be explained on the basis of extreme temperature variations as well as differences in heating in the factories.

The amount of heat in the factory at the time of filling seems to be important, for the higher the temperature in the plant the more conditions are equalized. In plant No. 1, the tests were made quite frequently so that it was possible to obtain a more or less accurate record of the length of time a vat of kraut was held for curing. In certain plants (Nos. 2, 3, 4, and 5), no artificial heat was used to warm up the building during the filling season. As a result, the temperature within the plant was about the same

as the outside temperature. The records of these plants, in general, show considerably slower rates of fermentation.

In 1929, in plant No. 2 the kraut in two vats only showed a rate of fermentation comparable to rates observed in plant No. 1. In all other cases the rate of fermentation was comparatively slow, many of the vats actually failing to reach a satisfactory acidity until the following spring. In plant No. 2, the relation between the rate of curing and the temperature was quite striking. For example, vat No. 1 which was packed during the cold period of September 19 to 21 (Fig. 1), required 91 days to attain 1.57 per cent acid. The kraut in vat No. 3 which was packed from September 25 to 27 during a warm period (Fig. 1), reached 1.46 per cent in 35 days and was taken out. The records show that only four other vats reaches acidities of 1.50 per cent or more. The two most rapidly fermenting vats were packed

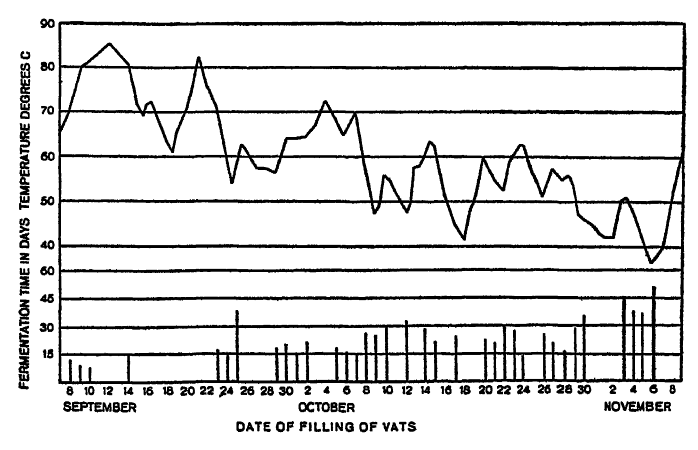


Fig. 3. The Daily Mean Atmospheric Temperature at the Time of Filling Compared with the Rate of Fermentation of Sauerkraut in Vats During 1931.

immediately after the two peak temperature periods, October 21 and November 2. The other two were packed on comparatively warm days.

In plant No. 3, as in No. 2, the rate of fermentation was also much slower than in plant No. 1, the most rapid curing requiring 46 and 47 days. In this plant, the rapidly fermenting vats of kraut were all filled during the peak days on the temperature curve.

In 1930, results were obtained in three plants other than plant No. 1. Fermentation in general was more rapid in the unheated buildings than in 1929, but this was apparently due to a warmer season. The vats of kraut in plant No. 2 again fermented at a rate practically inversely proportional to the temperature. For example, vat No. 6 packed at the end of the first cold period, was the slowest vat of the first nine. On the other hand, vat No. 15, packed during the warm spell after October 30, fermented the most rapidly of the last seven vats.

In plant No. 4 a test made on October 14 showed that the slowest fermentation of kraut in vats filled between September 6 and 27 was in the two vats filled after the coldest days, September 11 and 20. Otherwise, all of this kraut fermented rapidly.

Summary.

There is a close correlation between the temperature of fermenting cabbage and the rate of fermentation in the vat, i. e., the lower the temperature the slower the rate of fermentation.

Under commercial conditions several temperature factors are of importance.

When the temperature in the factory is high, the fermentation rate is more rapid because the cabbage is warmed in the process of shredding and packing.

The temperature of the cabbage is dependent upon the atmospheric temperature at the time it is cut in the field and finally stored in the wilting bins. Therefore, the lower the atmospheric temperature at the time the cabbage is cut the slower is the rate of fermentation.

The rate of transmission of heat thru wooden tanks into kraut is relatively slow. Therefore, altho heating a building after the shredded cabbage is in the vat hurries the rate of fermentation, its effect is not as great as ordinarily supposed. From the standpoint of economy, it seems to be advisable to heat the shredded cabbage before it enters the vat.

Altho it is possible to predict roughly the time necessary for a vat of kraut to ferment from the atmospheric temperature, there are enough other factors that govern the temperature of the shredded cabbage in the vat to make it impossible to predict such times accurately.

Nachdruck verboten.

The Effect of Inoculation on the Quality, Chemical Composition, and Bacterial Flora of Sauerkraut.

[New York Agricultural Experiment Station, Geneva, N. Y.]

By **Carl S. Pederson.**

The effect on a sauerkraut fermentation of the introduction of a living culture of bacteria as the shredded cabbage is packed has been shown to be variable, depending more or less on the type of organisms introduced[1]). Since the fermentation of sauerkraut is carried out by several different organisms growing in sequence, it would seem that if these organisms were introduced in mixed culture into the kraut, they might all play a role in the fermentation, resulting in a better kraut. It was believed, too, that this result might also be produced by adding kraut juice from a tank of kraut which has turned out well to another tank which has just been packed. These studies were made to note the effect upon a kraut fermentation of the addition at the start of a fermentation of various mixtures of pure cultures of bacteria or of kraut juice from another tank.

The Effect of the Addition of Mixtures of Pure Cultures.

Thirty-nine jars or barrels of kraut were prepared, each being inoculated with from two to four different types of bacteria in various mixtures.

1) For an historical review and more detailed data, see: New York Agric. Exp. Sta. Techn. Bull. No. 216. 1933. Approved by the Director of the New York State Agricultural Experiment Station for publication as Journal Paper No. 77.

The streptococcus of sour milk (*Streptococcus lactis* Lohnis) is not commonly found in kraut but has been used with success as a starter. A coccus (*Leuconostoc mesenteroides* Van Tiegham), a lactic-acid-producing rod (*Lactobacillus plantarum* [Orla-Jensen] Bergey et al.), and a gas-producing lactic rod (*Lactobacillus pentoaceticus* Fred et al.) are normally present during some stage in the fermentation of all kraut. In the experiments, attempts were made to grow these organisms in normal sequence, i. e., the coccus forms first followed by the rods, by using cocci in more abundant amounts in the inoculum. The results of this series of experiments are shwon in Table 1.

In the first of these combinations (kraut No. 93, Table 1), a starter was used which consisted of a mixture of the streptococcus and the coccus. The fermentation was apparently normal, the streptococcus apparently causing only a slightly lower volatile acid content than normal.

In the next series (kraut Nos. 48 and 103), a mixture of the streptococcus and the gas-forming rod was used as a starter. A very detrimental effect is attributable to the disturbance of the flora caused by the addition of the gas-producing rod. This was particularly noticeable in kraut No. 48 in which the rods predominated thruout the fermentation and thus produced a large percentage of volatile acid (0.436 per cent). The kraut had a very sharp acid flavor besides being somewhat slimy. Kraut No. 103 failed to ferment properly.

The third (kraut No. 104) and fourth (kraut Nos. 82 and 101) series were very similar to the second in that poor quality or abnormal kraut were produced. The krauts failed to ferment properly resulting in krauts of low acidity, poor quality, and soft texture. The rods predominated in all of these fermentations. In the case of kraut No. 104, inoculated with a mixture of 25 percent of the lactic rod, the effect of the presence of the lactic rod is shown in the low volatile acid content (0.164 per cent). Incidentally it was noted in this and in other experiments that low volatile acid production apparently favors yeast growth.

Eight jars of kraut were packed in the fifth series, the starter being a mixture of the coccus form and the lactic acid rod. The results at first appeared rather promising in that a more rapid fermentation resulted and the kraut produced in most cases was of good quality. However, an examination of the results secured in the series will show how difficult it is to control conditions properly. For example, kraut Nos. 69 and 83 fermented in a more or less normal sequence, the cocci appearing first and then the rods, altho the latter did not appear in large numbers. The volatile acid content was normal in these kraut and the kraut was of good quality. On the other hand, altho a larger proportion of the inoculum of the cocci was given in kraut Nos. 184, 187, 127, and 129 than had been used in kraut Nos. 69 and 83, the effect of the rods was more pronounced as may be noted from the lowered ratio between the volatile and non-volatile acidity. This emphasizes the difficulty in controlling such inoculation mixtures. If any combination of organisms will make a successful "starter" for sauerkraut, it should be this one. The krauts were fermented rapidly and without abnormal flavors.

In the sixth series of krauts in which the inoculum consisted of a mixture of the two rod forms, the starter had a very detrimental effect. The same result was secured when they were inoculated together, all of the krauts

Table 1. Analysis of Sauerkrauts Inoculated with Mixed Cultures of Micro-organisms.

Kraut No.	Series No.	Experiment No.	Percentage of Total Inoculum: Strepto-cocc. lactis	Leucon. mesenteroides	Lactobac. pentoaceticus	Lactobac. plantarum	Age of kraut in days	Total acid as lactic acid, per cent	Alcohol as ethyl alcohol, per cent	Volatile acid as acetic acid, per cent	Non-volatile acid as lactic acid, per cent	Ratio of volatile to non-volatile acid	Quality of kraut	Remarks
93	1	12	80	20	—	—	19	1.58	0.18	0.201	1.280	0.16	Excellent	
48	2	7	50	—	50	—	14	1.50	0.32	0.436	0.759	0.57	Poor	Slimy and sharp
103	—	12	75	—	25	—	47	1.41	0.41	0.235	1.058	0.22	Poor	Off flavor, unfermented
104	3	12	75	—	—	25	47	1.28	0.90	0.164	1.041	0.16	Poor	Soft, unfermented
82	4	11	—	67	33	—	23	1.42	0.49	0.265	1.025	0.26	Fair	Abnormal flavor and odor
101	—	12	—	50	50	—	60	1.23	0.49	0.230	0.886	0.26	Poor	Soft
58	5	8	—	50	—	50	23	1.44	0.77	0.183	1.165	0.16	Fair	Raw cabbage flavor
69	—	9	—	75	—	25	18	1.53	0.35	0.270	1.125	0.24	Good	—
83	—	11	—	67	—	33	16	1.49	0.47	0.285	1.067	0.27	Good +	—
102	—	12	—	50	—	50	18	1.54	0.36	0.240	1.240	0.16	Good +	—
184	—	19	—	80	—	20	17	1.71	0.28	0.240	1.350	0.18	Fair	Lacked kraut flavor
187	—	19	—	80	—	20	17	1.68	0.31	0.242	1.320	0.18	Fair	Lacked kraut flavor
127	—	14	—	85	—	15	26	1.54	0.66	0.270	1.140	0.24	Good	
129	—	14	—	85	—	15	26	1.59	0.69	0.250	1.220	0.21	Good	
50	6	7	—	—	50	50	14	1.47	0.29	0.100	1.317	0.08	Unfit	Slimy
57	—	8	—	—	50	50	23	1.44	0.34	0.215	1.117	0.19	Fair	Raw cabbage-like
59	—	8	—	—	33	67	23	1.67	0.52	0.252	1.287	0.20	Good	Abnormal flavor
70	—	9	—	—	50	50	21	1.44	0.32	0.293	1.000	0.29	Fair	Poor odor
84	—	11	—	—	50	50	17	1.56	0.34	0.293	1.117	0.26	Fair	Musty
85	—	11	—	—	50	50	21	1.50	0.42	0.237	1.148	0.21	Good	Off flavor
98	—	12	—	—	50	50	42	1.41	0.85	0.172	1.154	0.15	Unfit	Unfit
80	7	11	80	10	10	—	14	1.52	0.36	0.265	1.124	0.24	Excellent	—
90	—	11	70	15	15	—	19	1.51	0.61	0.272	1.104	0.25	Good	Odor abnormal
94	—	12	80	15	5	—	42	1.39	0.44	0.230	1.046	0.22	Fair	—
66	8	9	80	15	—	5	21	1.58	0.62	0.241	1.214	0.20	Good	—
67	—	9	80	15	—	5	18	1.58	0.65	0.255	1.193	0.21	Good	—
68	—	9	40	40	—	20	21	1.98	0.37	0.266	1.581	0.17	Good	Acid
81	11	11	80	10	—	10	14	1.50	0.43	0.267	1.093	0.24	Good +	+
49	9	7	33	—	33	33	14	1.30	0.31	0.112	1.147	0.10	Unfit	Very slimy
72	—	10	90	—	5	5	10	1.33	0.23	0.185	1.052	0.18	Fair	Abnormal
73	—	10	90	—	5	5	10	1.60	0.17	0.227	1.260	0.18	Good +	+
74	—	10	50	—	25	25	10	1.68	0.41	0.360	1.140	0.32	Poor	Abnormal
97	10	12	—	70	15	15	19	1.57	0.34	0.230	1.125	0.19	Good +	—
121	—	14	—	70	15	15	20	1.49	0.70	0.250	1.110	0.23	Good	—
185	—	19	—	70	15	15	17	1.54	0.32	0.226	1.250	0.19	Poor	Acid cabbage
188	—	19	—	70	15	15	17	1.65	0.48	0.236	1.300	0.18	Fair	Flat
78	11	10	60	30	5	5	10	1.60	0.16	0.299	1.152	0.26	Good	—
89	—	11	70	10	10	10	23	1.44	0.44	0.242	1.077	0.22	Fair +	Abnormal flavor
96	—	12	75	15	5	5	42	1.42	0.63	0.216	1.096	0.20	Fair	Abnormal

showing some striking abnormality. The rods naturally predominated in these fermentations. In this case the difficulty of control is also brought out. From the low amount of volatile acid produced in kraut Nos. 50 and 98, it may be seen that lactic acid rods which produce little volatile acid predominated in these fermentations, while the gas-producing rod (a volatile acid producer) predominated in kraut Nos. 70 and 84, the same proportion of inoculum being used in all cases. Of the seven krauts in this series, only two rated as good but even these were not normal.

In the seventh and eighth series the somewhat beneficial effect of inoculation with the streptococcus is again shown. In these cases, altho mixtures of the streptococcus, coccus, and rod forms were added as starters, the streptococcus and coccus forms made up 80 per cent or more of the starter. With one exception the fermentations were apparently normal in every way at least as far as could be determined by a microscopic study of the organisms, by chemical analyses, and by judgement of quality. Kraut No. 68, altho good, showed the effect of a heavier inoculation with the rod form in that the microscopic counts showed a large number of the rods. On the other hand, the kraut fermented rapidly and to a high acidity, the latter fact usually not holding true in the case of pure-culture inoculation with the lactic acid rods.

In the ninth series some very interesting results were secured which also emphasized the difficulty of control. Kraut Nos. 49 and 74 were given inoculations containing equal quantities of the two rod forms with the streptococcus, but in spite of this, the lactic-acid-producing rod predominated in the fermentation of kraut No. 49 and the gas-producing rod in that of kraut No. 74. This, of course, could not be shown by microscopic examination since the organisms are similar morphologically, but it is readily shown by the low volatile acid content in the former case (0.112 per cent) and the high volatile acid in the latter case (0.36 per cent). In contrast to these results and to each other are the results secured in kraut Nos. 72 and 73. The latter fermented more or less normally, a good kraut resulting. The kraut fermented quickly and the volatile acid content was slightly lower than usual. Microscopic examination indicated a normal fermentation. On the other hand, the fermentation of kraut No. 72, which received an inoculation similar to that of No. 73, showed not only a predominance of the lactic acid rods by microscopic examination, but also by the low volatile acid content (0.185 per cent) as well as by the abnormal flavor. This took place in spite of the low percentage of the lactic acid rods in the total inoculum. Incidentally, these two krauts (Nos. 72 and 73) were packed in experiment No. 10 and therefore under conditions that were thought to be indentical.

The tenth and eleventh series brought out further the inconsistent results that may be obtained from mixed inoculation. Kraut Nos. 97 and 121 were good but kraut Nos. 185 and 188, packed under the same conditions, were poor and fair, respectively, altho all four received inoculations consisting of the same proportions of the two rod forms and the coccus. The eleventh series of krauts was inoculated with a starter consisting of all four organisms. Altho one kraut was good, the other two were abnormal.

The Effect of Inoculation with Kraut Juice.

Thirty-one barrels or jars of kraut were packed with juice from tanks of fermenting kraut as inoculum, and at the same time nine control krauts

were prepared. Of the nine control krauts, the quality of eight was rated as good and one as fair. The krauts were all fermented quickly, requiring from 11 to 20 days to attain 1.50 per cent or more of acid. The volatile acid content ranged from 0.302 to 0.353 per cent.

The average condition of the inoculated krauts was poor. If the data are examined more fully (Table 2), especially from the standpoint of the acidity or the different ages of the juice used as an inoculum, it may be noted that the quality of kraut produced is decidedly variable and depends somewhat upon the age of the juice added.

Of 11 krauts inoculated with juice with an acidity of 1.00 per cent or more only 2 rated as good, the others being fair, poor, or unfit in quality. Chemical analyses of these krauts showed a more or less normal condition. A few showed a low volatile acid content, while a few showed a relatively high volatile acid content. The true condition is shown by microscopic examination of samples taken at intervals during the fermentation. A particularly high long rod content was noted thruout the fermentation in all cases, the cocci failing to take their normal part in the fermentation.

Four samples were inoculated with juice testing from 0.63 to 0.91 per cent acid. Such juice possibly should contain the various types of organisms for it is taken during the transition stage of the fermentation or the stage in which the cocci are decreasing in numbers while the rods are developing. The highest quality kraut in this series rated only as fair. Microscopic study showed that the cocci developed to some extent, but a rapid overgrowth of rods took place.

Five krauts were packed with an inoculum of juice with acidities between 0.30 and 0.45 per cent. Three of these rated fair in quality while the other two were poor. These krauts, with one exception, showed a fairly normal condition from the standpoint of chemical analyses. The microscopic study of one of these showed only a slight development of the cocci followed by normal development of rods.

Six krauts were packed with juice containing between 0.22 and 0.25 per cent acid. All six of these rated as good and their chemical analyses showed a normal condition. Microscopic study showed a condition very similar to that found in a normal fermentation, that is, the fermentation was started by the coccus forms and continued until about 0.9 per cent was produced. The cocci then disappeared and shortly after the rods completed the fermentation.

Five other barrels packed with juice which contained between 0.10 and 0.18 per cent acid, also developed a satisfactory sauerkraut, four rating good in quality and one rating fair. The development of acidity and growth of organisms in these were also normal. One of the krauts showed a low volatile acid content. The last 11 samples of kraut were all fairly good, but careful comparison with the normal controls failed to show any marked beneficial or harmful effect.

Discussion and Summary.

In general, there seems to be little doubt from these experiments that whenever an inoculum consists predominately of the lactic-acid-producing rods (Lactobacillus plantarum), which produce little or no volatile acid, or of the gasproducing rods (Lactobacillus pentoaceticus), which produce relatively large quantities of volatile acid,

Table 2. Analysis of Sauerkraut Inoculated with Sauerkraut Juice.

Kraut No.	Juice used as inoculant: Age in days	Juice used as inoculant: Total acid as lactic acid	Age of kraut in days	Total acid as lactic acid, per cent	Alcohol as ethyl alcohol, per cent	Volatile acid as acet. acid, per cent	Non-volatile acid as lact. acid, per cent	Ratio of volatile to non-volatile acid	Quality	Remarks
65	7	1.39	13	1.61	0.25	0.285	1.184	0.24	Good +	—
134	5	1.35	23	1.36	—	0.268	0.938	0.28	Unfit	Pink spot, poor flavor
135	8	1.32	23	1.56	—	0.301	1.108	0.27	Fair	Slightly soft
136	15	1.28	20	1.39	—	0.300	0.940	0.32	Poor	Pink spots, musty
145	7	1.13	24	1.61	—	0.336	1.106	0.30	Good —	—
146	10	1.48	11	1.68	—	0.365	1.133	0.32	Fair	Raw flavor
148	Old	1.60	14	1.56	—	0.297	1.115	0.22	Unfit	White, soft
153	39	1.24	11	1.68	0.35	0.321	1.200	0.27	Fair	Abnormal flavor
161	18	1.25	14	1.56	1.34	0.265	1.162	0.22	Poor	—
162	39	1.77	11	1.67	0.30	0.354	1.140	0.31	Good	Raw flower
173	—	1.42	8	1.78	—	0.180	1.510	0.12	Fair	Lacked kraut flavor
140	3	0.87	72	1.41	—	0.354	1.030	0.24	Unfit	—
152	Old	0.91	11	1.61	0.33	0.187	1.330	0.14	Poor	Abnormal flavor
157	18	0.81	11	1.72	0.32	0.314	1.250	0.25	Poor	—
164	8	0.63	17	1.64	0.80	0.318	1.163	0.26	Fair	Abnormal flavor
64	4	0.45	14	1.77	0.22	1.164	1.418	0.12	Poor	Odor and flavor abnormal
131	1	0.30	20	1.47	—	0.342	0.953	0.36	Fair	Abnormal odor
133	2	0.34	23	1.62	—	0.304	1.164	0.26	Fair	Musty
141	2	0.44	72	1.52	—	0.259	1.130	0.23	Poor	—
163	5	0.40	17	1.52	0.95	0.278	1.103	0.25	Fair	Raw
132	1	0.22	20	1.41	—	0.330	0.915	0.36	Good	Slightly abnormal
142	2	0.22	39	1.53	—	0.305	1.072	0.26	Good	—
144	3	0.25	17	1.67	—	0.342	1.157	0.29	Good —	—
151	2	0.24	11	1.65	0.24	0.331	1.154	0.29	Good	Raw
155	5	0.25	17	1.65	0.83	0.301	1.198	0.25	Good —	Spotted
160	2	0.22	14	1.74	0.67	0.324	1.254	0.26	Good	—
130	1	0.17	23	1.45	—	0.279	1.032	0.27	Fair	Rancid flavor
150	1	0.16	14	1.68	0.34	0.313	1.210	0.26	Good	—
158	1	0.16	11	1.56	0.22	0.275	1.147	0.23	Good	Raw
171	—	0.10	8	1.66	—	0.260	1.270	0.21	Good +	—
172	—	0.18	8	1.62	—	0.185	1.342	0.14	Good	—
137	Control	—	20	1.69	—	0.312	1.222	0.26	Good +	—
138	Control	—	20	1.62	—	0.316	1.146	0.28	Good	—
139	Control	—	20	1.66	—	0.353	1.130	0.31	Good	—
143	Control	—	24	1.54	—	0.303	1.085	0.28	Good	—
147	Control	—	17	1.58	—	0.330	1.085	0.30	Good	—
149	Control	—	11	1.67	0.28	0.339	1.161	0.29	Good	—
154	Control	—	17	1.61	0.69	0.302	1.157	0.26	Fair	—
156	Control	—	14	1.74	0.61	0.324	1.254	0.26	Good	—
159	Control	—	11	1.62	0.24	0.307	1.160	0.26	Good	—

the resulting sauerkraut is abnormal. This abnormal condition may express itself either as sharp or acid flavors, musty flavors, soft kraut, lack of kraut flavor or a cabbage-like flavor, the development of slimy juice or the development of yeast, or sometimes pink yeast with the resultant pink color. These changes are not necessarily produced by the organisms themselves, but may be due to secondary changes caused by growth of other organisms which are more or less inhibited in their activity in a normal fermentation. From the standpoint of chemical analyses the abnormal fermentations are usually evidenced in a low or a high volatile acid content dependent upon whether the lactic-acid-producing rods (Lactobacillus plantarum) or the gas-producing rods (Lactobacillus pentoaceticus) are the predominating type.

On the other hand, when either of the coccus forms (Streptococcus lactis or Leuconostoc mesenteroides) are the predominating organisms, the normal sequence of growth apparently is not upset to any great extent since normal kraut results. If any beneficial effect is to be obtained by culture inoculation, these two organisms offer the most promising results in that they tend to suppress the rod forms in the early part of the fermentation. This might be helpful especially during warm weather or when an incorrect amount of salt is added; conditions which appear to favor rapid development of the rod forms. Certainly one may conclude that inoculation with these organisms has not shown any tendency to hurry the fermentation or to produce a kraut that is superior to a normally good kraut.

The use of a starter consisting of sauerkraut juice yielded results consistent with those obtained with pure cultures and mixed cultures or organisms used in a similar way.

The effect of the addition of juice from another kraut which is either partly or fully fermented to shredded cabbage as packed depends to a great extent upon the types of organisms present in the juice which can be determined somewhat by the acidity of the kraut juice.

It the juice has an acidity of 0.30 per cent or more, the kraut produced by adding such juice is usually of poorer quality than normal kraut. The cocci (Leuconostoc mesenteroides) which normally start fermentation under these conditions are suppressed so that the greater part of the fermentation is attributable to the rod forms (Lactobacillus plantarum and Lactobacillus pentoaceticus).

If the juice has an acidity of 0.25 per cent or less the kraut produced is apparently normal, but no definitely beneficial effects effects are found. Such juice is comparable to a starter composed of a pure culture of Leuconostoc mesenteroides in that this organism predominated in kraut juice at this stage.

Because of the fact that the organisms in old kraut juice have a detrimental effect upon the fermentation of freshly cut cabbage, the use of such juice as a starter cannot be recommended.

Nachdruck verboten.

Stickstoffbindung durch keimende Leguminosensamen ohne Mitwirkung von Knöllchenbakterien?

[Aus dem Institut fur angewandte Botanik der Universität Hamburg, Direktor: Prof. Dr. G. Bredemann.]

Von **Kyrill Girtschanoff**[1]).

A. Einleitung.

Vor einiger Zeit brachte Nerina Vita (1932, I) die Mitteilung, daß ihr bei ihren im Chemischen Institut der Hochschule fur industrielle Chemie in Bologna angestellten Untersuchungen der Nachweis gelungen sei, daß keimende Leguminosensamen unter gewissen Bedingungen große Mengen von elementarem Stickstoff aufnehmen könnten, auch wenn durch entsprechendes Keimfreimachen jede bakterielle Wirkung ausgeschlossen wurde. Dieser ersten Mitteilung folgten bald 2 weitere (1932, II u. III), in denen die uberraschenden Befunde bestätigt und erweitert wurden. Vita teilte in genannten Arbeiten zunächst mit, daß sie bei vollig steriler Keimung von Leguminosen in einer Atmosphäre, die neben N geringe Mengen O_2 und große Mengen CO enthielt, beobachtet habe, daß die Atmosphäre gegen den 10. Tag an N verarmte. N-Bestimmungen in den Samen und in den jungen Keimpflanzen zeigten dann, daß der Gesamt-N-Gehalt im Verlaufe der Keimung wesentlich anstieg. Es wurden (auf 100 g Trockensubstanz berechnet) innerhalb 4 Wochen Zunahmen bis zu 1,88 g N bei einem Anfangsgehalt der Samen von 5,29 g N gefunden! Da zermahlene Leguminosensamen unter gleichen Bedingungen keinerlei Änderung ihres Gesamt-N-Gehaltes zeigten, schloß Vita, daß die in ihren Versuchen festgestellte N-Aufnahme an den Lebensprozeß der Samen bzw. Keimpflanzen gebunden sei und ausgelöst werde durch Reizwirkung des Gasgemisches auf ein in den Samen vorhandenes N-bindendes Enzym, „Azoligase" benannt, dessen Tätigkeit unter normalen Verhältnissen bei bakterienfreier Keimung nicht sichtbar in Erscheinung trete. Die gleiche Reizwirkung wurde von Vita in weiteren Untersuchungen dann auch durch verdunnte Alkaloidlösungen (Strychnin und Coffein) sowie durch verschiedene Metallsalzlosungen ($MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, K_2SO_4) bei steriler Kultur festgestellt, auch in gewohnlicher Luft, und zwar sowohl im Hellen wie im Dunkeln. Während der bis zu 4 Wochen dauernden Versuche nahm der N-Gehalt der keimenden Samen zuerst bis zu einem bestimmten Maximum stufenweise zu, dann wieder ab (nach Vita ebenfalls durch die Enzymtätigkeit der Azoligase hervorgerufen), bei den verschiedenen geprüften Leguminosen und unter den verschiedenen Wachstumsbedingungen verschieden, aber in allen Versuchen ohne Ausnahme. In den Versuchen mit Alkaloid-Zusatz z. B. stieg der N-Gehalt bei Erbsen (Anfangsgehalt 3,55% N) auf 3,58—4,50%, bei Pferdebohnen (Anfangsgehalt 3,80%) auf 3,98—5,15%!, in den Versuchen mit Mineralsalz-Zusatz bei Erbsen (Anfang 2,99%) auf 3,16—4,78%, bei Lupinen (Anfang 4,88%) auf 4,90—6,38%. Das würde also Zunahmen bis zu

[1]) Erschienen als Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universitat Hamburg.

1,88 g N auf 100 g Trockensubstanz ausmachen und bis zu 50% N-Zunahme gegenüber dem Anfangsgehalt bedeuten!

Diese gewiß ebenso interessanten wie überraschenden Ergebnisse nachzuprüfen, erschien wichtig. Ich habe damit im Juli 1933 auf breiter Grundlage begonnen. Kurz vor dem Abschluß meiner Untersuchungen erschien eine Arbeit von Haritantis aus dem Laboratorium für landwirtschaftliche Chemie der Universität Saloniki (1934), der die Versuche von Vita mit Alkaloiden (Strychninnitrat und Brucin) an Lupinus albus und Erbsen bei etwas abgeänderter Versuchsanstellung wiederholte und Vitas Befunde bestätigte, wenn auch die N-Zunahmen etwas geringer waren, bei Lupinen zwischen 0,10 und 0,71 g N auf 100 g Trockensubstanz und bei Erbsen zwischen 0,10 und 0,69 g. Sterilisierte und nicht sterilisierte Samen verhielten sich annähernd gleich.

Im einzelnen wird auf die Versuchsergebnisse genannter beiden Forscher bei der Diskussion meiner Resultate (S. 360) zurückgekommen. Ich konnte, um es vorweg zu nehmen, die Befunde von Vita und Haritantis in keiner Weise bestätigen.

B. Versuchsanstellung. — Allgemeines.

Die Versuche wurden größtenteils mit Samen von Lupinus luteus L. durchgeführt, ein Teil auch mit Samen von Pisum sativum L. Um für alle Versuche nach Möglichkeit gleichmäßiges Material benutzen zu können, wurden zu Beginn der Versuche größere Mengen der Samen 5—8 Min. mit lauwarmem Wasser gewaschen, abgespült und in dünner Schicht über Nacht trocknen gelassen. Die so gereinigten Samen wurden in einer gut verschlossenen Flasche während der Dauer der Versuche kühl aufbewahrt. Ihre Keimfähigkeit blieb in dieser Zeit unverändert. Wassergehalt und N-Gehalt wurden während der Versuchsdauer wiederholt kontrolliert, letzterer außerdem bei jeder Versuchsreihe durch blinde Versuche (s. Tabellen).

Es war bei der verhältnismäßigen Ungleichartigkeit der großkörnigen Samen von vornherein klar, daß nur mit einer größeren Anzahl von Parallelen ausgeführte Versuche einwandfreie Ergebnisse erwarten ließen. Alle Versuche sind daher in zehnfacher Wiederholung durchgeführt. Vita sowohl wie Haritantis machen keine genauen diesbezüglichen Angaben. Jeder dieser 10 Parallelversuche wurde mit 30 Stück Samen angesetzt. 30 Samen der Gelblupine wiegen etwa 5 g, 30 Erbsensamen etwa 6 g. Wie nötig es ist, zur Ausschaltung der Ungleichartigkeit des Samenmaterials eine so große Anzahl von Parallelversuchen durchzuführen und diese weiter mit einer nicht zu kleinen Anzahl von Samen, zeigen deutlich die in Tabelle 1 unter Spalte c mitgeteilten Ergebnisse von N-Bestimmungen in Einzelsamen: Das Samenmaterial, wie es vorlag, wurde mit der Hand in große, mittlere und kleine Samen sortiert, jeder Same der 3 Gruppen einzeln gewogen und in jedem einzelnen Samen der N-Gehalt mikrochemisch bestimmt. Bei den größten Lupinensamen (Einzelgewicht 290—223 mg) schwankte der N-Gehalt des einzelnen Samens zwischen 8,54 und 6,99%, bei den mittelgroßen (Einzelgewicht 178—151 mg) zwischen 8,14 und 6,81% und bei den kleinsten (Einzelgewicht 117—75 mg) zwischen 7,86 und 5,92%, und die Mittelwerte aus je 30 Bestimmungen in jeder der drei Gruppen betrugen 7,80, 7,49 und 6,84% N.

Die zu jedem Versuch verwendeten 30 Samen wurden daher aus der Probe (s. o.) wahllos, aber mit der Vorsicht abgezählt, daß nach Möglichkeit keine unfreiwillige Sortierung nach Korngröße stattfand. Nur offensichtlich verschrumpfte oder beschädigte, keimunfähige Samen wurden beim Abzählen ausgeschaltet. Daß es auf diese Weise zwar gelingt, die im Samen begründeten Ungleichmäßigkeiten weitgehend, aber doch nicht ganz auszuschalten, zeigen die Einzelwerte der blinden und Kontrollversuche der Tabellen 1—6. Aber die Mittelwerte aus den 10 Parallelen stimmen trotzdem sehr gut überein. In 13 blinden und Kontrollversuchen mit ungekeimten Lupinensamen: 7,49, 7,53, 7,49, 7.50, 7,49, 7,50, 7,53, 7,55, 7,56, 7,53, 7,54, 7.51, 7,51%, Mittel aus 130 Parallelen mit je 30 Lupinensamen 7,52% N und in 5 Kontrollversuchsreihen mit in Wasser gekeimten Samen: 7,50, 7,53, 7,53, 7,52, 7,51%, Mittel aus 50 Parallelen mit je 30 Lupinensamen 7,52% N. Diese Werte beweisen, daß mit 10 Parallelserien ausreichend genaue Zahlen zu erhalten sind.

Die abgezählten 30 Samen wurden genau gewogen und dann zum Keimen angesetzt. In Parallelproben wurde der Wassergehalt der Samen bestimmt, so daß also die zu jedem Versuch angesetzte Trockensubstanzmenge der Samen genau bekannt war. Als Keimbetten dienten stets hochwandige Petrischalen von 9 cm Durchmesser, deren Boden mit 2 Lagen runder Filtrierpapierscheiben ausgelegt wurde. Watte, wie sie Vita und auch Haritantis zu ihren Versuchen benutzten, wurde absichtlich vermieden. Denn Watte ist durchaus nicht N-frei, sondern enthält bisweilen beträchtliche Mengen N. Wir fanden bei verschiedenen Qualitäten 0,3—2% N! Da die Keimunterlagen für die N-Bestimmung mit verbrannt werden müssen, kann somit die Verwendung von Watte zu wesentlichen Fehlern führen und hat das auch sicherlich schon getan. Wir kommen hierauf in der Diskussion meiner Ergebnisse (S. 361) zurück. Die Filtrierpapierscheiben waren praktisch N-frei. Sie wurden mit destilliertem Wasser angefeuchtet, zuerst stark, später jeden Tag nach Bedarf. Bei denjenigen Versuchen, die in gewöhnlicher Luft durchgeführt wurden, blieben die Schalen zuerst mit den Deckeln bedeckt. Am 2. Tage wurden sie kontrolliert und die noch nicht gequollenen („hartschaligen") Samen mit einer Nadel sorgfältig angestochen, worauf in Kürze Quellung und Keimung erfolgte. Nach einigen Tagen, mit fortschreitender Entwicklung der Keimpflanzen, wurden die Deckel abgenommen. Besondere Sorgfalt muß natürlich auf gleichmäßiges Feuchthalten gelegt werden. Die bei der Keimung abgestreiften Samenschalen, ebenso verunglückte Keimpflanzen oder nichtkeimende Samen, wie sie vereinzelt nicht ausblieben, wurden stets sorgfältig mit der Pinzette herausgenommen, in kleinen Schälchen gesammelt und getrocknet (um später wieder mit der Gesamtmasse vereinigt zur N-Bestimmung verbrannt zu werden). Dieses Auslesen war nötig, um N-Verluste durch Schimmelbildung während der bis zu 28 Tagen dauernden Versuche zu vermeiden. Bei den in besonderen Gasgemischen ausgeführten Versuchen wurden alle Lupinensamen vorher leicht angestochen (bei Erbsen unnötig); ein Herausnehmen der abgestreiften Samenschalen und ungekeimt gebliebenen Samen konnte bei diesen Versuchen natürlich nicht erfolgen.

Die N-Bestimmungen wurden stets nach Kjeldahl-Jodlbaur ausgeführt. Der gesamte Inhalt der Keimschalen, Keimpflanzen (und ihr gesondert gesammelter Abfall) nebst Filtrierpapierunterlagen wurde frisch in die Aufschlußkolben überführt, die Keimschalen sorgfältig mit destilliertem Wasser nachgespült und das Ganze in bekannter Weise aufgeschlossen. Die Mineralisierung erfolgte ziemlich rasch, besonders

bei den Keimpflanzen. Grundsätzlich wurde nach völligem Farbloswerden noch 1 bis 2 Std. weiter erhitzt. Nach erfolgtem Aufschluß wurde auf 500 ccm aufgefüllt und hiervon 100 ccm zur Destillation verwendet, so daß also für erforderliche Parallel-Destillationen ausreichende Reserve zur Verfügung stand. Vorgelegt wurde n/5 H_2SO_4, titriert mit n/10 KOH unter Verwendung von Kongorot als Indikator. In 30 Stück Gelblupinensamen, etwa 5 g, waren etwa 310—350 mg N enthalten, in 30 Erbsensamen, etwa 6 g, etwa 217—241 mg N. Die Umrechnung erfolgte auf N %, bezogen auf die ursprüngliche Trockensubstanz der Samen (siehe auch S. 361/362).

Tab. 1. N %, auf Trockengewicht berechnet, in je 30 Stück Gelblupinensamen bestimmt.

a) ungekeimte Gelblupinensamen			b) in destill. Wasser gekeimte Gelblupinensamen		c) einzelne Gelblupinensamen								
					größte Samen			mittelgroße Samen			kleinste Samen		
am 17. 5. 33	am 19. 1. 34	am 11. 6. 34	nach 15 Tg.	nach 23 Tg.	Einzelgewicht: 290—223 mg			Einzelgewicht: 178—151 mg			Einzelgewicht: 117—75 mg		
7,51	7,55	7,53	7,51	7,60	8,10	7,70	8,23	7,63	8,14	7,49	7,05	7,26	6,42
7,48	7,54	7,50	7,51	7,69	7,66	7,85	8,04	7,29	7.39	7,65	7,54	6,16	7,02
7,50	7,59	7,42	7,53	7,33	7,24	7,27	8,54	7,34	7,41	6,81	7.67	7,53	5,92
7,52	7,64	7,46	7,48	7,53	7,66	7,90	8,28	7,48	7,43	7,33	6.86	6,54	7,41
7,44	7,55	7,42	7,59	7,50	8,09	6,99	7,99	7,57	7,16	7,22	7.03	7,32	7,07
7,52	7,43	7,39	7,46	7,47	8,19	7,81	8,09	7,50	7,09	7.62	7,86	7,33	6,75
7,59	7,47	7,57	7,54	7,57	7,84	8,22	7,78	7,46	7,39	7,86	6,41	6,79	6,63
7,50	7,45	7,57	7,36	7,53	8,13	7,70	7,04	7,30	7,69	7,68	6,62	5,96	7,13
7,44	7,56	7,61	—	—	7,60	8.20	7,27	7,83	7,80	7,67	6,12	7,05	7,10
—	7,55	7,43	—	—	7,47	7.78	7,46	7,59	7,66	7,68	6,02	7,23	7,34
7,49	7,53	7,49	7,50	7,53	7,80	7,74	7,87	7,50	7,46	7,50	6,82	6,92	6,78
M.-W.: 7,51%			7,52%		7,80%			7,49%			6,84%		

C. Ausführung der Versuche.

I. Versuchsreihe: Versuche in Gegenwart von verschiedenen Metallsalzen als Katalysatoren.

Die Durchführung der Versuche erfolgte im Anschluß an die Versuchsanstellung von Vita und Sandrinelli (1932, III), und zwar ebenfalls mit Lupinen. Außer K_2SO_4, $MgSO_4$, $MnSO_4$ und $FeSO_4$ wurde auch Molybdän in Form von Na_2MoO_4 mit herangezogen. Denn Bortels hat 1930 festgestellt, daß die N-Bindung durch Azotobacter in Gegenwart geringer Mengen eines Molybdänsalzes sehr viel intensiver verläuft, was von Birch-Hirschfeld (1932) sowie von M. Schröder (1932) bestätigt werden konnte, und was mit den Analysenbefunden Ter Meulens (1931) in gewissem Einklang steht.

Die Versuchsanordnung im einzelnen geht aus Tabelle 2 und 3 hervor. Der Zusatz der Mineralsalzlösung erfolgte beim K_2SO_4 vor der Keimung, indem das Keimbett mit 5 ccm n/10 000 K_2SO_4-Lösung befeuchtet wurde; am 3. und 14. Tage erhielt jede Schale nochmals je 5 ccm derselben Lösung.

Bei den übrigen Mineralsalzlösungen wurden die Lupinensamen zuerst auf den Filtrierpapierscheiben mit destilliertem Wasser zur Keimung gebracht und vom dritten Tage ab die Mineralsalzlösungen im Abstand von einigen Tagen zugefügt, nach Bedarf außerdem destilliertes Wasser (Tab. 2 u. 3). Die mit K_2SO_4 genährten Lupinen-Keimpflanzen zeigten ein außerordentlich üppiges Wachstum. Auch in $MgSO_4$ und in $MnSO_4$ war bei der gewählten Versuchsanstellung das Wachstum sehr gut. Die geringen Mengen

Tab. 2. Keimen und Wachsen der Gelblupinensamen in Metallsalzlosungen.

N-%, auf Trockengewicht berechnet, in je 30 gekeimten Gelblupinensamen bestimmt																Kontrollen
K_2SO_4 0,00782 g K-Ionen/Ltr.				$K_2SO_4 + Na_2MoO_4$ 0,00782 g K-Ionen/Ltr. + 0,00096 g Mo-Ionen/Ltr.				$MnSO_4 \cdot 5\,H_2O$ 0,02746 g Mn-Ionen/Ltr.				$MnSO_4 \cdot 5\,H_2O + Na_2Mo_4$ 0,02746 g Mn-Ionen/Ltr. + 0,00096 g Mo-Ionen/Ltr.				je 30 Lupinensamen nach 20 Tagen trocken verbrannt
am 1., 3. und 14. Tage je 5 ccm								am 3. Tage je 5 ccm, am 12. und 16. Tage je 2 ccm								
8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg	16 Tg.	20 Tg.	
7,22	7,60	7,55	7,47	7,62	7,60	7,57	7,60	7,55	7,52	7,66	7,58	7,67	7,59	7,49	7,45	7,49
7,45	7,29	7,58	7,51	7,61	7,46	7.67	7,40	7,29	7,46	7,35	7,41	7,59	7,61	7,60	7,61	7,44
7,39	7,51	7,44	7,42	7,50	7,31	7,22	7,67	7,46	7,60	7,39	7,42	7,58	7,54	7,62	7,56	7,43
7,66	7,49	7,46	7,41	7,63	7.58	7,51	7,43	7,58	7,42	7,49	7,53	7,48	7.33	7,44	7,55	7,63
7,72	7,57	7,32	7,52	7.53	7.34	7,65	7,66	7,63	7,55	7,54	7,54	7,39	7,64	7,53	7,58	7,44
7,51	7,63	7,58	7,57	7,46	7,58	7,24	7,62	7,60	7,44	7,41	7,52	7,58	7,48	7,43	7,56	7,45
7,55	7,28	7,46	7,47	7,43	7,51	7,52	7,24	7,70	7,56	7,46	7,63	7,57	7,57	7,63	7,57	7,54
7,49	7,67	7,49	7,49	7,61	7,42	7,53	7,33	7.44	7,61	7,56	7,48	7,32	7,41	7,53	7,52	7,58
7,59	7,56	7,49	—	7,34	—	7,47	7,49	—	7,49	7,55	7,49	7,45	7,65	7,59	7,51	7,49
7,64	7,52	—	—	—	—	7,55	7,48	—	7,52	—	7,51	—	7,56	7,54	—	7,49
7,52	7,51	7,49	7,48	7,52	7,47	7,49	7.49	7,53	7,52	7,51	7,51	7,51	7,54	7,54	7,54	7,50

Tab. 3. Keimen und Wachsen der Gelblupinensamen in Metallsalzlösungen.

N-%, auf Trockengewicht berechnet, in je 30 gekeimten Gelblupinensamen bestimmt																Kontrollen
$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,002792 g Fe-Ionen-Ltr.				$FeSO_4 \cdot 7\,H_2O + Na_2MoO_4$ 0,002792 g Fe-Ionen/Ltr. + 0,00096 g Mo-Ionen/Ltr.				$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$ 0,01216 g Mg-Ionen/Ltr.				$MgSO_4 \cdot 7\,H_2O + Na_2MoO_4$ 0,01216 g Mg-Ionen/Ltr. + 0,00096 g Mo-Ionen/Ltr.				je 30 Lupinensamen nach 20 Tagen trocken verbrannt
am 3. und 10. Tage je 2 ccm								am 5., 10., 14. und 18. Tage je 1 ccm								
8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	8 Tg.	12 Tg.	16 Tg.	20 Tg.	
7,55	7,53	7,72	7,60	7,46	7,56	7,40	7,33	7,39	7,37	7,56	7,53	7,64	7,64	7,48	7,45	7,60
7,40	7,44	7,49	7,50	7,43	7,46	7,50	7,52	7,66	7,61	7,51	7,55	7,64	7,52	7,51	7,40	7,45
7,30	7,44	7,51	7,48	7,45	7,66	7,50	7,54	7,47	7,47	7,44	7,55	7,42	7,46	7,47	7,44	7,56
7,57	7,61	7,44	7,56	7,33	7,51	7,47	7,47	7,47	7,54	7,57	7,58	7,49	7,59	7,59	7,56	7,32
7,63	7,52	7,53	7,46	7,67	7,44	7,49	7,37	7,52	7,57	7,55	7,57	7,40	7,59	7,54	7,56	7,45
7,50	7,56	7,38	7,54	7,46	7,59	7,68	7,64	7,43	7,57	7,54	7,56	7,52	7,55	7,44	7,52	7,49
7,58	7,70	7,62	7,55	7,42	7,50	7,59	7,62	7,49	7,64	7,59	7,53	7,57	7,60	7,55	7,55	7,53
7,58	7,53	7,55	7,54	7,50	7,42	7,63	7,45	7,60	7,49	7,56	7,52	7,56	7,59	7,55	7,55	7,47
7,45	7,49	7,47	7,45	7,67	7,43	7,51	7 53	7,69	7,53	7,56	7,46	7,48	7,42	7,55	7,47	7,47
7,55	7,57	7,59	—	7,54	7,44	7,53	7,57	7,58	7,41	7,55	7,43	—	7,52	—	—	7,49
7,52	7,53	7,53	7,52	7,49	7,50	7,53	7,50	7,52	7,51	7,54	7,53	7,52	7,52	7,52	7,50	7,49

des zugesetzten Na_2MoO_4 störten das Wachstum nie. $FeSO_4$ dagegen hemmte anfangs stark, später aber erholten sich die Keimpflänzchen und wuchsen ebenfalls gut.

Von einer Sterilisierung der Samen wurde Abstand genommen. Wir wollten zunächst nur feststellen, ob überhaupt N-Zunahme stattfand. Knöllchenbildung haben wir bei diesen kurzfristigen Versuchen bis zu 20 Tagen niemals beobachtet, ebensowenig wie später Haritantis, der auch zum Teil mit nichtsterilisierten Samen arbeitete und bei diesen annähernd gleiche N-Zunahmen fand wie bei den sterilisierten. Die Keimschalen standen während des Versuches bei Zimmertemperatur im diffusen Licht eines Nordzimmers.

Die Ergebnisse der N-Bestimmungen sind in den Tabellen 2 und 3 zusammengefaßt. Sie zeigen, daß N-Zunahmen in keinem Falle festgestellt werden konnten.

II. Versuchsreihe: Versuche in Gegenwart von Alkaloiden als Stimulantien.

a) Coffein und Chininsulfat.

Die Versuche wurden in grundsätzlich gleicher Weise durchgeführt wie bei der I. Versuchsreihe: Gelblupinensamen, nicht keimfrei gemacht, Petrischalen zuerst mit Deckel bedeckt, später offen, Zimmertemperatur, diffuses Licht eines Nordzimmers. Samen zuerst 4 Tage im Keimbett mit destilliertem Wasser angekeimt, dann im Abstand von mehreren Tagen (s. Tab. 4) je 1 ccm der $1^0/_{00}$- bzw. $2^0/_{00}$-Alkaloidlösungen gleichzeitig mit dem erforderlichen (destillierten) Gießwasser zugesetzt. Nachteiliger Einfluß auf die Entwicklung der Keimpflänzchen wurde nicht beobachtet.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Auch in dieser Versuchsreihe konnte N-Zunahme in keinem Falle festgestellt werden.

b) Strychninnitrat.

Vita will in einigen Fällen günstigen Einfluß verminderten Sauerstoffgehaltes der Luft auf die N-Assimilation festgestellt haben. Die diesbezüglichen Versuche wurden in verschlossenen Glasglocken ausgeführt — 15 g Samen in 14 l Glockenraum —, „wo sich infolge der Prozesse der Aufnahme und der Atmung eine Atmosphäre mit ungefähr 8% Sauerstoff einstellte“.

In ähnlicher Weise wurde in dieser Versuchsreihe vorgegangen: Große Glasglocken von ungefähr 40 l Inhalt wurden mit je 10 offenen Keimschalen (= rund 50 g Gelblupinensamen bzw. 60 g Erbsensamen) beschickt und mit Bromdampf sterilisiert (siehe unten). Um die Keimfreiheit zu erhalten, wurde folgende Vorrichtung getroffen: Die unten plangeschliffenen Glasglocken wurden auf Spiegelglasplatten gesetzt, auf welche Glasleisten aufgekittet waren. In die so entstandene Wanne wurde um die Glocke herum Wasser als Absperrflüssigkeit gegossen. Hierdurch wurde eine ziemlich gute Regelung des Luftdruckes in den Glocken erreicht, indem, je nachdem die Luft kälter oder wärmer wurde, nur Wasser, aber keine atmosphärische — nicht keimfreie — Luft in die Glocken hinein bzw. wieder aus ihnen heraus konnte. Die Keimschälchen standen natürlich erhöht, um von dem eintretenden Wasser nicht berührt zu werden. Jede Glasglocke war mit 2 Öffnungen versehen, einer oberen und einer seitlichen unteren. Auf die obere Öffnung der Glocke wurden 2 Scheidetrichter aufgesetzt, deren in die Glocken hineinragende Stiele so gebogen waren, daß man durch Drehen der Scheidetrichter sämtliche Keimschalen mit Alkaloidlösung bzw. sterilem Gießwasser versehen konnte. Mittels der seitlichen Öffnung waren alle Glocken untereinander verbunden, und das ganze System wurde täglich bis zum Ende des Versuches mit steriler Luft durchströmt. Zwischen die seitlichen Verbindungen geschaltete Dreiweghähne ermöglichten, daß man die Glocken voneinander absperren und einzeln öffnen konnte, was jeweils am 8., 13. und 19. Tage bei je 2 Glocken erfolgte.

Tab. 4. Keimen und Wachsen der Gelblupinensamen

N %, auf Trockengewicht berechnet, in je									
Coffeïn 1‰				Coffeïn 2‰				Blinde Versuche	
1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	trockene Samen je 30 Stuck verbrannt	je 30 trockene Samen + 4 ccm 2‰ Coffeïnlosg. verbrannt
10 Tg.	20 Tg.	24 Tg.	28 Tg.	10 Tg.	20 Tg.	24 Tg.	28 Tg.		
7,55	7,51	7,49	7,68	7,68	7,36	7,75	7,42	7,42	7,43
7,54	7,44	7,49	7,58	7,60	7,58	7,58	7,61	7,57	7,48
7,45	7,53	7,54	7,50	7,42	7,48	7,55	7,50	7,56	7,66
7,53	7,68	7,55	7,40	7,53	7,60	7,59	7,62	7,50	7,55
7,46	7,53	7,45	7,48	7,50	7,49	7,54	7,45	7,42	7,65
7,50	7,42	7,44	7,43	7,58	7,45	7,59	7,41	0,05% entsprech.	7,53
7,62	7,44	7,51	7,54	7,49	7,67	7,51	7,56	Menge Coffeïn-N	7,72
7,50	7,61	7,42	7,47	7,63	7,52	7,55	7,54	in 4 ccm 2‰	7,71
7,54	7,50	7,57	7,44	7,68	7,53	7,46	7,56	zugerechnet	7,52
7,43	7,51	—	7,48	7,60	7,49	7,65	—		7,56
7,51	7,52	7,49	7,50	7,57	7,52	7,58	7,52	7,55	7,58
7,50[1])	7,51	7,47	7,47	7,56	7,49	7,54	7,47	7,50	7,53

[1]) Werte dieser Reihe ohne Alkaloid-N.

Tab. 5. Keimen und Wachsen der Gelblupinen- und Erbsensamen in Strychninnitratlösung (1,5‰ je 20 ccm).

N-%, auf Trockengewicht berechnet, in je 30 gekeimten Samen bestimmt									
Versuch mit Gelblupinensamen					Versuch mit Erbsensamen				
8 Tagen	13 Tagen	19 Tagen	Kontrollen: ohne Strychninnitrat-N, bis 19 Tg. gekeimt[1])	Blind. Vers.: je 30 trockene Samen + 20 ccm 1,5‰ Strychninnitratlösung verbrannt	8 Tagen	13 Tagen	19 Tagen	Kontrollen: ohne Strychninnitrat-N, bis 19 Tg. gekeimt[1])	Blind. Vers.: je 30 trockene Samen + 20 ccm 1,5‰ Strychninnitratlösung verbrannt
7,62	7,54	7,56	7,57	7,70	4,42	4,51	4,38	4,24	4,39
7,66	7,54	7,67	7,50	7,68	4,40	4,22	4,39	4,33	4,38
7,65	7,53	7,53	7,51	7,63	4,22	4,34	4,42	4,38	4,59
7,59	7,51	7,44	7,29	7,82	4,39	4,32	4,46	4,39	4,53
7,75	7,53	7,54	7,45	7,61	4,28	4,33	4,32	4,34	4,41
—	7,69	7,59	7,62	7,60	4,32	4,36	4,40	4,44	4,37
7,59	7,65	7,63	7,69	7,50	4,43	4,44	4,39	4,24	4,41
7,96	7,61	7,62	7,58	7,63	4,31	4,46	4,44	4,26	4,44
7,49	7,51	7,52	7,47	7,68	4,29	4,32	4,41	4,27	4,31
7,55	7,56	7,61	7,51	7,49	4,31	4,33	4,43	4,26	4,31
7,61	7,57	7,57	7,62	7,63	4,34	4,36	4,40	4,40	4,42
Wert ohne Alkaloid-N.									
7,52	7,48	7,48	7,53	7,54	4,25	4,27	4,31	4,31	4,33

[1]) Die entsprechende Menge Alkaloid-N in 20 ccm von 1,5‰ — 0,09% — ist dem Mittelwert zugerechnet.

Diese Versuchsreihe wurde, wie erwähnt, unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Keimfreimachung geschah in der Weise, daß die fertig montierten und mit Gelblupinen- bzw. Erbsensamen auf trockenen Keim-

in Coffeïn- und Chininsulfatlösungen.

30 gekeimten Gelblupinensamen bestimmt									
Chininsulfat 1°/$_{00}$				Chininsulfat 2°/$_{00}$				Blinde Versuche	
1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	1 ccm	2 ccm	3 ccm	4 ccm	trockene Samen je 30 Stück verbrannt	je 30 trockene Samen + 2°/$_{00}$ Chininsulfatlösg. verbrannt
10 Tg.	14 Tg.	20 Tg.	24 Tg.	10 Tg.	14 Tg.	20 Tg.	24 Tg.		
7,46	7,45	7,62	7,49	7,58	7,54	7,41	7,66	7,53	7,56
7,39	7,40	7,46	7,60	7,57	7,55	7,53	7,59	7,51	7,70
7,50	7,56	7,61	7,49	7,45	7,42	7,45	7,49	7,55	7,58
7,62	7,60	7,50	7,51	7,45	7,48	7,58	7,67	7,53	7,65
7,41	7,52	7,55	7,57	7,55	7,47	7,63	7,57	7,62	7,49
7,56	7,45	7,58	7,53	7,43	7,59	7,45	7,60	0,02% entsprech.	7,52
7,44	7,52	7,49	7,57	7,71	7,59	7,59	7,63	Menge Chininsul-	7,51
7,40	7,54	7,56	7,52	7,48	7,47	7,61	7,45	fat-N in 4 ccm	7,56
7,55	7,53	7,53	7.57	7,49	7,64	7,65	7,54	2°/$_{00}$ zugerechnet	7,57
7,60	—	7,64	7,55	7,40	7,65	7,54	7,55		7,68
7,49	7,52	7,54	7,54	7,51	7.54	7,54	7,57	7,57	7,58
7,49	7,52	7,53	7,53	7,50	7,53	7,53	7,55	7,55	7,56

betten beschickten Glasglocken 4 Std. lang mit Bromdampf ausgeräuchert wurden. Der Bromdampf wurde dann mit einem zuvor auf 100° erhitzten und wieder abgekühlten sterilen Luftstrom 2—3 Std. lang herausgetrieben. Diese Art der Sterilisierung hat sich gut bewährt, es wurden niemals verfaulte Samen oder abgefallene verschimmelte Samenschalen beobachtet, deren Entfernung während der Versuche ja nicht möglich war (s. S. 351). Nach erfolgter Sterilisierung wurden durch den einen Scheidetrichter jeder offenen Keimschale 20 ccm 1,5°/$_{00}$iger Strychnin-Nitratlösung zugesetzt. Gießwasser war in diesem Falle nicht nötig. Durch den anderen Scheidetrichter wurde in eine leere Schale Kalilauge in die Glasglocke fließen gelassen zum Zwecke der CO_2-Absorption. Die Glocken standen während des Versuches bei Zimmertemperatur und im diffusen Licht eines Nordzimmers.

Die Keimfähigkeit war in der Strychninlösung sehr gut, das weitere Wachstum der Keimpflänzchen etwas verzögert gegenüber dem Wachstum in den Metallsalzlösungen (s. S. 352).

Die Kontrollen zu diesen Versuchen wurden in gewöhnlicher Luft durchgeführt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengestellt. Auch in dieser Versuchsreihe konnte wiederum in keinem Falle N-Zunahme festgestellt werden.

III. Versuchsreihe: Versuche in Gegenwart von CO-Gas als Stimulans.

a) Keimen und Wachsen der Samen dauernd in 60%, 50, 40 und 30% CO-Gasatmosphäre.

Die Apparatur zu diesen Versuchsreihen war die gleiche wie bei der Versuchsreihe II b mit Strychninnitrat. Nach erfolgter 4stündiger Sterilisierung mit Bromdampf und Verdrängung dieses mit keimfreier Luft wurde die Apparatur zunächst mit CO-Gas gefüllt. Das CO wurde aus Ameisensäure und Schwefelsäure entwickelt. Zuerst ging es durch eine Gasuhr, dann durch eine Waschflasche mit H_2SO_4 und dann

durch eine solche mit Wasser. So wurde das CO-Gas durch die hintereinander geschalteten Glocken 5 Std. hindurchgeleitet, bis alle Luft ausgetrieben war. Dann wurde aus 2 Bomben in gleicher Weise zuerst N-, dann O-Gas in den gewünschten Konzentrationen (siehe Tab. 6) zugeleitet und darauf die letzte Glocke mit der ersten verbunden, so daß diese also ringförmig untereinander angeschlossen waren. Durch die Scheidetrichtervorrichtung wurden alsdann den Keimschalen die erforderlichen Mengen sterilen destillierten Wassers zugesetzt und einer weiteren Schale Kalilauge für die CO_2-Absorption. Um in allen Glocken ganz gleiches Gasgemisch zu gewährleisten, wurde das Gasgemisch jeden Tag mehrmals durch alle untereinander verbundenen Glocken hindurchgepreßt. Diese Zirkulation wurde bewirkt durch eine Vorrichtung von zwei großen, mittels Gummischläuchen verbundenen Flaschen, von denen die eine mit Wasser gefüllt war. Durch Heben und Senken derselben wurde dann das Gasgemisch von der einen Seite der Glockenreihe abgesaugt und von der anderen in die Glocken hineingepreßt. Die ganze Apparatur war völlig luftdicht so aneinandergeschlossen, daß durch Auf- und Zudrehen von Glashähnen das Gasgemisch rasch und sicher durch das Glockensystem bewegt werden konnte.

Auch diese Glocken standen bei Zimmertemperatur im diffusen Licht eines Nord-Zimmers.

Die Gelblupinensamen keimten in der CO-Atmosphäre ganz gut. Aber die weitere Entwicklung war sehr kümmerlich. Bei 60% CO-Gehalt blieben die Würzelchen innerhalb 30 Tagen nur 1—3 cm lang, die Kotyledonen ergrünten, aber weitere Blätter wurden nicht gebildet. Bei geringeren CO-Konzentrationen war das Wachstum ein etwas besseres, in allen Fällen blieb es aber sehr kümmerlich.

In die Versuchsreihe mit 60% CO-Gehalt wurden 2 besondere Blindversuche eingeschaltet: Unter die Glocken kamen zusammen mit den übrigen Keimschalen 2 Serien von je 10 Petrischalen, von denen die eine Serie die üblichen beiden Filtrierpapierscheiben, aber keine Samen enthielt, die wie die übrigen Keimschalen mit angefeuchtet wurden, während die andere Serie mit den üblichen Filtrierpapierscheiben und je 30 Gelblupinensamen belegt, aber nicht angefeuchtet wurde. Nach Abschluß des Versuches wurden zu der ersten Blindserie bei den N-Bestimmungen je 30 trockene Gelblupinensamen mit verbrannt.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 6, a zusammengestellt (in der ersten Serie nach 10 Tagen war eine Anzahl Keimschalen durch von unten in die Glocken eingedrungenes Wasser verdorben, da die Schalen damals noch nicht erhöht aufgestellt waren, s. S. 355). Die Zahlen lassen wiederum keinerlei N-Aufnahme erkennen.

b) Die Samen wurden 6 Tage an der Luft vorgekeimt und kamen dann in ein 60% CO enthaltendes Gasgemisch.

Um nachzuprüfen, ob das Ausbleiben einer N-Aufnahme in letztgenannter Versuchsreihe, also unter ganz gleichen Bedingungen, unter denen Vita gerade recht erhebliche N-Zunahmen feststellte, vielleicht dadurch bewirkt sein könnte, daß die Keimpflänzchen durch das CO stark in ihrer Entwicklung gehemmt waren, wurde der Versuch nochmals wiederholt mit der Abänderung, daß die Gelblupinensamen nach der Sterilisierung mittels Bromdämpfen in den Glasglocken zunächst 6 Tage lang in gewöhnlicher (keimfreier) Luft angekeimt wurden. Nachdem dann die Keimlinge Blätter getrieben hatten, wurde ein Gasgemisch von 60% CO eingeleitet und die Keimlinge in ihm 10, 15 bzw. 20 Tage lang weiter belassen. Die Schädlichkeit des CO auf die Keimpflanzen zeigte sich auch hier bald: Das Wachstum hörte nach dem Einleiten des Gasgemisches auf, die Keimpflanzen waren

Tab. 6. Versuch in CO-, N_2- und O_2-Gemisch.

a) Keimen und Wachsen der Gelblupinensamen dauernd in der Gasatmosphäre											b) Vorkeimen der Gelblupinensamen an der Luft, Weiterwachsen in der Gasatmosphäre			
N-%, auf Trockengewicht berechnet, in je 30 gekeimten Gelblupinensamen bestimmt														
Gasgemisch			Blind-Versuche		Kontrollen	Gasgemisch			Kontrollen	Gasgemisch			Kontrollen
CO = 60%, N_2 = 32%, O_2 = 8%			je 30 trockene Samen + Keimpapier ohne Nährflüssigkeit	Nährflüssigkeit + Keimpap. + trockene Samen (je 30 Stück)	in gewöhnlicher Luft gekeimt (je 30 Samen)	18 T.: CO 30, N_2 55, O_2 15%; 20 T.: CO 40, N_2 47, O_2 13%; 24 T.: CO 50, N_2 40, O_2 10%			in gewöhnlicher Luft gekeimt (je 30 Samen)	CO = 60%, N_2 = 32%, O_2 = 8%			in gewöhnlicher Luft gekeimt (je 30 Samen)
10 Tg.	20 Tg.	30 Tg.	30 Tage	30 Tage	22 Tage	18 Tage	20 Tage	24 Tage	24 Tage	10 Tg.	15 Tg.	20 Tg.	20 Tage
7,52	7,59	7,56	7,61	7,53	7,53	7,44	7,51	7,54	7,54	7,53	7,64	7,69	7,52
7,54	7,47	7,51	7,51	7,65	7,48	7,58	7,43	7,54	7,68	7,51	7,59	7,52	7,49
7,52	7,47	7,65	7,43	7,58	7,59	7,41	7,50	7,57	7,46	7,40	7,58	7,60	7,53
7,62	7,49	7,55	7,53	7,45	7,49	7,37	7,53	7,60	7,43	7,45	7,57	7,45	7,46
—	7,45	7,40	7,45	7,49	7,55	7,53	7,41	7,50	7,60	7,54	7,50	7,50	7,66
—	7,51	7,50	7,52	7,64	7,51	7,65	7,40	7,57	7,51	7,56	7,50	7,40	7,41
—	7,54	7,53	7,50	7,46	7,58	7,39	7,51	7,48	7,38	7,54	7,49	7,47	7,49
—	7,49	7,33	7,42	7,39	7,57	7,52	7,50	7,36	7,65	7,54	7,61	7,51	7,42
—	7,49	7,70	7,49	7,45	7,50	7,54	7,50	7,42	7,57	7,51	7,58	7,58	7,51
—	7,48	7,33	7,63	—	7,53	7,55	7,59	7,46	7,39	7,56	7,59	7,47	7,62
7,55	7,50	7,51	7,51	7,51	7,53	7,50	7,49	7,50	7,52	7,51	7,56	7,52	7,51

bei Beendigung der Versuche am 19. Tage noch genau so klein wie am Tage des Einleitens des Gasgemisches, ohne dabei Krankheitserscheinungen zu zeigen.

Auch bei diesen Versuchen wurde keinerlei N-Aufnahme festgestellt (Tab. 6, b).

D. Diskussion der Ergebnisse.

Vorliegende Versuche und Ergebnisse zeigen also, daß in keinem Falle eine N-Aufnahme durch keimende Leguminosensamen nachgewiesen werden konnte. Dieses Ergebnis steht in vollem Widerspruch zu den von Vita und von Haritantis veröffentlichten Arbeiten. Es erhebt sich daher sofort die Frage, wie diese widersprechenden Befunde zu erklären sind bzw. wodurch sie verursacht worden sein können.

Wie schon erwähnt, befinden sich weder in den Arbeiten von Vita noch in denen von Haritantis präzise Angaben darüber, in wievielfacher Wiederholung sie ihre Untersuchungsreihen ausführten. Vita gibt nur an, daß der Mittelwert der Kontrollen, auf den alle Zunahmen zu beziehen sind, „aus zahlreichen Versuchen gewonnen" wurde bzw. — an einer anderen Stelle —, daß dieser Mittelwert „in vielen wiederholten Untersuchungen, sowohl an trockenen wie auch an in destilliertem Wasser gekeimten Samen" gewonnen sei. Aber die N-Assimilationsversuche selbst scheinen ohne Parallelen durchgeführt zu sein. Wenigstens wird darüber nichts mitgeteilt, auch nicht, ob die N-Analysenwerte Mittelwerte aus solchen Parallelen und aus wievielen sind. Haritantis dagegen teilt durchweg drei Parallelen mit.

Nun geht aus allen meinen an je 30 Samen (rund 5—6 g) ausgeführten Blindbestimmungen sowohl mit ungekeimten als auch an in destilliertem Wasser gekeimten Samen deutlich hervor, daß im Einzelversuch recht schwankender N-Gehalt gefunden wird. Das ist bei einem so ungleichartigen Material, wie es die großkörnigen Lupinen- und Erbsensamen sind, ja auch gar nicht anders zu erwarten. Die N-Bestimmungen in den Einzelsamen verschiedener Größe (s. Tab. 1, Spalte c) haben den verschiedenen N-Gehalt der verschiedenen Samen, der stark von der Korngröße, aber beim Einzelsamen doch auch von anderen Eigenschaften abhängig ist, deutlich gezeigt: Maximal 8,54, minimal 5,92% N bei den Gelblupinen. Bei sorgfältiger Abzählung der zu jedem Versuch benötigten 30 Samen, wahllos, aber mit der Vorsicht, daß nach Möglichkeit keine unfreiwillige Sortierung nach Korngröße stattfindet, verwischen sich die Unterschiede zwar weitgehend, aber immerhin schwankte der N-Gehalt, der im Mittel aller 18 blinden und Kontrollversuche, 180 Einzeluntersuchungen von je 30 Gelblupinensamen, 7,52% N betrug, doch noch zwischen 7,20 und 7,68%. Ich habe aus diesem Grunde alle Versuche in zehnfacher Wiederholung durchgeführt, und wir haben gesehen (s. S. 350/351), daß eine so große Zahl von Parallelen immer ausreichend übereinstimmende Mittelwerte gibt.

Es leuchtet aber ohne weiteres ein, daß diese Ungleichmäßigkeit des Materials bei ungenügender Anzahl von Parallelversuchen zu erheblichen Fehlschlüssen führen kann. In obengenanntem Beispiel — Minimum 7,20, Maximum 7,68% N — hätten wir einen Unterschied von 0,48% N. Und wenn wir die Einzelwerte in den Arbeiten von Vita und Haritantis durchsehen, finden wir sehr häufig Werte, die sich zwischen 0,1 und 0,3% anscheinender „N-Zunahme" bewegen. Allerdings sind die „Zunahmen" so-

wohl bei Vita als auch bei Haritantis in vielen Fällen erheblich höher, besonders bei Vita, wo sie bis zu 50% des Anfang-N-Gehaltes betragen, also Werte erreichen, wie wir sie bei unseren Blindversuchen als unterschiedliche Werte zwischen klein- und großkörnigen Gelblupinen gefunden haben (5,92—8,54% N).

Bei Verwendung gemahlener Lupinensamen konnte Vita keine N-Zunahme feststellen und gründete auf dieser Beobachtung bekanntlich die Theorie, daß es ein nur im lebenden Samen tätiges Enzym, die „Azoligase", sei, das die N-Aufnahme bewirke. Man kann aber auch wohl vermuten, daß es nur die durch das Zermahlen einer größeren Samenmenge bewirkte Gleichmäßigkeit des Materials — in meinen Versuchen durch 10fache Parallelen erzielt — gewesen ist, das in diesem Falle keinen verschiedenen N-Gehalt ergab!

Abgesehen von diesem Falle wollen beide Forscher aber in allen Versuchen ohne Ausnahme N-Zunahmen festgestellt haben[1]).

Vita führte die N-Bestimmungen nach Kjeldahl-Ulsch aus und erwähnt an einer Stelle (1932, III, S. 84), „daß mit dieser Methode kleine Fehler vorkommen können". Aber da man wohl weder annehmen kann, daß zufälligerweise die zu den Blindversuchen verwendeten Samen in allen Fällen kleinkörniger oder sonstwie N-ärmer gewesen sind, noch daß die Analysenfehler immer gerade bei den Blindversuchen (bzw. bei den Assimilationsversuchen) auftraten, müssen weitere Ursachen vermutet werden, die eine N-Aufnahme vorgetäuscht haben können. Die Möglichkeit einer solchen scheint mir in der Verwendung von Watte als Keimbett zu liegen, die sowohl Vita als auch Haritantis benutzten. Watte ist, wie erwähnt, durchaus nicht N-frei. Darauf wies schon Engel (1929) hin und gleichfalls Garber (1935), welcher auch erwähnt, daß der N-Gehalt der Watte darauf zurückzuführen sei, daß man dem Spülwasser, mit dem die Bleichsäuren bei der Wattebleichung herausgewaschen werden, etwas essigsaures Ammoniak zur Vermeidung nachträglichen Gelbwerdens zusetze, oder auch darauf, daß, wenn bei der Fabrikation der Watte die Proteine nicht restlos herausgekocht werden und sich beim Bleichen mit Chlor Chloramine gebildet haben, diese dann nicht mehr herausgespült werden können. Der N-Gehalt von mir untersuchter Watten schwankte zwischen 0,3% bei gereinigter, bis 2% bei ungereinigter Watte. Vita gibt nicht an, wieviel Watte und ob bei allen Versuchen gleiche Mengen auf den Keimbetten benutzt wurden, auch nicht, ob bei den Blindversuchen gleiche Wattemengen mit verbrannt wurden. Haritantis erwähnt, daß er zu seinen Kontrollversuchen je 1 g sterilisierte Watte mit verbrannt habe. Wenn man aber seine Versuchsanordnung betrachtet, erscheint es zweifelhaft, ob er mit nur 1 g Watte als Keimbett ausgekommen ist, wovon auch nichts erwähnt wird, sondern nur, daß „der Boden mit einer bei allen Reihen gleichen Schicht sterilisierter Watte bedeckt" worden sei.

Jedenfalls ist außer Frage, daß genannte Umstände bedenkliche Fehlerquellen bergen, die sehr wohl imstande sind, schon jede einzeln für sich, verstärkt natürlich beim Zusammentreffen mehrerer, zu Fehlschlüssen zu führen.

In seinem während der Niederschrift dieser Arbeit erschienenen Referat über die Veröffentlichung von Haritantis sagt Engel (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II,

[1]) In den Arbeiten von Vita werden sogar zweimal „Abnahmen" von 0,04 bzw. 0,11% als „Zunahmen" berechnet!

Bd. 91. 1934. S. 205/6), daß sowohl den Versuchen von Vita wie denen von Haritantis ein prinzipieller Fehler anhafte, der darin bestehe, daß der Gesamt-N der Samen während der Keimung auf Trockensubstanz bezogen worden sei. Da die Trockensubstanzmenge der Samen während der Keimung abnehme, müsse ihr relativer N-Gehalt bei gleichbleibender absoluter N-Menge zunehmen, mit dem Entfalten und Ergrünen der ersten Blätter und der beginnenden Photosynthese aber notwendig wieder abnehmen. Hier liegt allerdings ein Irrtum Engels vor; denn Vita und Haritantis bezogen, ebenso wie wir, den in den Keimpflänzchen ermittelten Gesamt-N-Gehalt nicht auf die Trockensubstanz der Keimpflänzchen, sondern auf die ursprüngliche Trockensubstanz der Samen selbst. Das geht aus der Darstellung von Vita zweifelsfrei hervor, indem sie schreibt (1932, II), daß die Samen sorgfältig gewogen, sterilisiert und keimen gelassen wurden und daß dann zur N-Bestimmung die ganze Masse zerstört wurde, die aus Samen, Watte und durchtränkender Flüssigkeit bestand. Zwar wird unmittelbar im Anschluß etwas unklar mitgeteilt „die Versuche wurden immer mit 5 g Trockensubstanz ausgeführt" und „es wurde für jede Portion Samen der Prozentgehalt an N in der Trockensubstanz bestimmt". Aber es scheinen das nur inkorrekte, vielleicht durch die Übersetzung ins Deutsche verursachte Ausdrücke zu sein; denn in der 3. Arbeit wird ausdrücklich wieder betont, daß von der N-Bestimmung nach Dumas Abstand genommen sei, da der N in einer aus Watte, durchtränkender Flüssigkeit, keimenden Samen usw. bestehenden heterogenen Masse bestimmt werden mußte, und höchstwahrscheinlich durch Trocknung Fehler entstanden wären. Auch Haritantis schreibt deutlich, daß er die Samen zuvor genau abgewogen auf die Keimbetten gebracht habe und dann zur N-Bestimmung in den Keimlingen den „Inhalt der Keimungsflaschen, bestehend aus Keimlingen, Watte und durchtränkender Alkaloidlösung" in einen Kjeldahl-Kolben überführt und nach Zusatz von 25 ccm Schwefelsäure verbrannt habe; die Werte der N-Gehalte seien dann in Prozenten „auf Trockensubstanz berechnet" angegeben. Wäre der von Engel vermutete Fehler gemacht, hätte vor der Verbrennung der Trockensubstanzgehalt der Keimlinge ermittelt werden müssen, was bei beiden Forschern nirgends erwähnt wird und technisch bei der gewählten Versuchsanstellung auch kaum ausführbar gewesen wäre.

Dieser von Engel vermutete Fehler scheidet also aus, aber ich glaube, daß die beiden von mir obengenannten Fehlerquellen — ungenügende Berücksichtigung der Ungleichmäßigkeit des Materials bei ungenügender Anzahl von Parallelversuchen und ungenügende Berücksichtigung des N-Gehaltes der als Keimbett benutzten Watte — die vermeintlichen N-Zunahmen sehr wohl erklären können.

Auch die Wiederabnahme des N-Gehalts im späteren Verlauf der Versuche, die sowohl Vita als auch Haritantis beobachteten, lassen sich auf die gleichen Fehlerquellen zurückführen. Zunächst einmal traten sie durchaus nicht regelmäßig ein, sondern es werden auch Versuche mitgeteilt mit regelmäßiger N-Zunahme bis zum Abschluß des Versuches. Und wenn wir uns in der Arbeit von Haritantis, der Einzelzahlen der Parallelen mitteilt, diese etwas genauer ansehen, so finden wir z. B.:

Tabelle 1.	Nach 16 Tagen:	—,	5,76,	5,84%
	„ 30 „ :	5,75,	5,63,	5,70%
„ 5.	„ 16 „ :	5,60,	5,62,	5,70%
	„ 30 „ :	5,60,	5,53,	5,48%
„ 6.	„ 16 „ :	5,57,	—,	5,69%
	„ 24 „ :	5,52,	5,44,	5,58%
„ 12.	„ 16 „ :	3,98,	4,02,	3,83%
	„ 24 „ :	3,85,	3,78,	3,93%

usw. Mir scheint, solche Werte, bedingt durch die Ungleichmäßigkeit des Samenmaterials und an einer ungenügenden Anzahl von Parallelen ermittelt, lassen keinen Rückschluß auf eine Abnahme des N-Gehalts im zweiten Versuchsstadium zu.

E. Zusammenfassung.

Es wurden eine ganze Reihe von Versuchen mit keimenden Leguminosensamen (gelbe Lupinen und Erbsen) angestellt, um nachzuprüfen, ob sie unter dem Einfluß verschiedener Stimulantien — Metallsalze, Alkaloide, Kohlenoxydgas — den elementaren N unmittelbar ohne Mitwirkung von Knöllchenbakterien zu assimilieren vermögen, wie kürzlich Vita nach-

gewiesen und Haritantis bestätigt zu haben glaubt. In keinem Falle konnte jedoch eine Aufnahme von elementarem N durch die keimenden Leguminosensamen nachgewiesen werden. Es wird vermutet und zu begründen versucht, daß Vita sowohl wie Haritantis durch unzureichende Versuchsanstellung zu Fehlschlüssen gelangten.

Die vorstehende Arbeit wurde in dem Staatsinstitut für angewandte Botanik der Hamburgischen Universität auf Anregung von Herrn Professor Dr. G. Bredemann ausgeführt.

Meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. Bredemann, danke ich von ganzem Herzen aufrichtig für das rege Interesse, das er meinen Untersuchungen entgegengebracht hat. Meinen Dank spreche ich auch Herrn Dr. Möbius für seine mir bei den chemischen Untersuchungen gewährte Hilfe aus. Außerdem einen recht herzlichen Dank Herrn Lassen, der mir in den manchmal ziemlich komplizierten technischen Angelegenheiten sehr behilflich war.

Schriftenverzeichnis.

1. Birch-Hirschfeld, L., Über den Einfluß von Molybdän und Bodenextraktstoffen auf die Stickstoffbindung von Azotobacter chroococcum. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 3. 1932. S. 341—361.) — 2. Bortels, H., Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. (Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 333—392.) — 3. Engel, H., Beiträge zur Kenntnis des Stickstoffumsatzes grüner Pflanzen. (Planta. Bd. 7. 1929. S. 135—164.) — 4. Garber, K., Über die Physiologie der Einwirkung von Ammoniakgasen auf die Pflanzen. Dissertation Hamburg. 1935. — 5. Haritantis, B. J., Einige Beobachtungen über die Stickstoffbindung durch Leguminosensamen. (Ztschr. f. Pflanzenernähr., Bodenkde. u. Düng., Abt. A, Bd. 34. 1934. S. 257—265.) — 6. Ter Meulen, H., Sur la Repartition du Molybdène dans la Nature. (Rec. d. Trav. chim. d. Pays-Bas. T. 50. 1931. p. 491—504.) — 7. Schröder, M., Die Assimilation des Luftstickstoffs durch einige Bakterien. (Zentralbl. f. Bakteriol., Abt. II, Bd. 85. 1932. S. 177—212.) — 8. Vita, N., Über die Ausnützung des atmosphärischen Stickstoffs durch keimende Samen (Beobachtungen an Lupinensamen bei besonderen Umgebungsbedingungen). (Biochem. Ztschr. Bd. 245. 1932. S. 210—217.) — 9. Vita, N., Über die Ausnützung des atmosphärischen Stickstoffs durch keimende Samen. II. Beobachtungen an keimenden Hülsenfruchtsamen in Gegenwart von Alkaloiden. (Biochem. Ztschr. Bd. 252. 1932. S. 278—291.) — 10. Vita, N. und Sandrinelli, R., Über die Ausnützung des atmosphärischen Stickstoffs durch keimende Hülsenfruchtsamen. III. (Biochem. Ztschr. Bd. 255. 1932. S. 82—87.)

Nachdruck verboten.

The Urea-decomposing Microflora of Soils.

I. Description and Classification of the Organisms.

[From the Department of Bacteriology, College of Agriculture, Edinburgh.]

By T. Gibson.

With 2 plates.

Micro-organisms which bring about an ammoniacal decomposition of urea have been investigated frequently since the beginnings of bacteriology, and a large number of ureaclastic bacteria have been described and named. It is clear, however, that many of these organisms have never been adequately characterised, and there is much uncertainty attaching to their classification. The existing information concerning the urea-splitting bacteria of soils is especially indefinite: not only are there difficulties in identifying previously-named organisms, but there is considerable divergence in the findings of different investigators concerning the types which occur in soils. This lack of precise knowledge is probably due to several factors, but it appeared likely that if a considerable number of cultures were isolated by different methods from soils of various types, it would be possible to describe the urea-decomposing microflora of soils more accurately than has hitherto been possible. In this investigation 174 urea-splitting organisms were isolated from soils and studied in pure culture. Nearly two-thirds of the organisms may be classified in the Bacillus Pasteuri group. An account of this group has been published elsewhere (Gibson, 4, 5, 7). Sarcina ureae, which appears to be a common soil organisms, has also been described previously (Gibson, 6). The description and classification of the remaining cultures, some of which appear to be new species, is dealt with in this paper. Part II will contain the results of a quantitative examination of certain soils, a description of experiments which indicate the relative importance of different organisms in the ammonification of urea, and a comparison of the findings of this investigation with those of previous workers.

The artificial Culture of Urea-decomposing Bacteria.

The methods of selective culture used in isolating the organisms referred to in this paper are mainly those which have been described previously (Gibson, 4, 6), but additional information concerning these procedures will be given in Part II.

Without exception, all the urea-decomposing bacteria which have been investigated find optimal conditions for vegetative growth in media containing comparatively high concentrations of peptone and meat extract. Bouillon, agar and gelatin prepared from 1 per cent peptone and 1 per cent meat extract were found to be suitable for general use, and in the following discussion media with this composition are referred to without a qualifying designation. All the organisms, with the exception of a few types which produce a feeble action on urea, either prefer or require alkaline media containing ammonia. These requirements are most easily satisfied by adding

urea prior to sterilisation, provided that the media are used soon after preparation. Agar and gelatin containing 2 per cent urea and sterilised by intermittent steaming, are suitable plating media for the actively ureaclastic bacteria, but lower concentrations of urea allow the less active organisms to grow more profusely. In gelatin for stab cultures 1 per cent urea is sufficient to provide the necessary conditions. In the propagation of stock cultures, where comparatively large amounts of growth are transferred to a new medium, lower concentrations of urea are preferable. A medium suitable for stock cultures of all the organisms is an agar containing 0.25 per cent urea sterilised in the autoclave, but many of the less active organisms may be maintained successfully on ordinary agar with a pH of 7.5. None of the spore-forming bacteria investigated are capable of producing spores freely on substrates which support luxuriant vegetative growth, and in many of the organisms it is difficult to elicit sporulation. An agar which encourages the production of spores by all the types contains 0.5 per cent peptone, 0.5 per cent meat extract and 0.5 per cent NH_4Cl. Its reaction is adjusted to approximately the limiting acidity for the particular strain. Spores are produced more abundantly as a rule at 22° C. than at higher temperatures which permit of more rapid growth.

In this work ability to decompose urea was ascertained by cultivating the organisms in 2 per cent urea bouillon sterilised by steaming, and by titrating 1 ccm quantities of the cultures with standard acid. Organisms were not accepted as being urea decomposers unless they were capable of forming at least 1 mg of ammoniacal nitrogen from urea in each cubic centimetre of culture. It is realised that many micro-organisms which produce some urease are incapable of fulfilling the conditions imposed, but in the past bacteria which do not develop a definite titratable alkalinity in urea media have not been regarded as urea-decomposing types. The standard of urease activity adopted here appears to be a suitable one, for borderline organisms were found infrequently, and it is unlikely that bacteria and fungi which produce a feebler action on urea play an important rôle in the ammonification of this substance in soils.

The Bacillus Pasteuri Group and related Bacteria.

The B. Pasteuri group appears to embrace the most numerous and also the most active urea-splitting bacteria found in soils. In previous publications (4, 5, 7) this group was described as consisting of a series of spore-forming bacilli which require or prefer alkaline media containing ammonia. Several types of the organisms are individually distinctive, but are so completely connected by transitional forms that the group constitutes a relatively homogeneous entity. It is possible, however, to divide the group arbitrarily into three types: (a) B. Pasteuri, which forms spherical or slightly ovoid spores in a terminal or sub-terminal position, and decomposes completely the urea in bouillon containing 2 per cent of this compound within 48 hours; (b) B. Loehnisii, morphologically similar to (a) but acting more slowly upon urea; and (c) B. Freudenreichii, which differs from (b) in producing ovoid to elliptical spores in a central or excentric position. Each of the three species contains strains which differ in the size of the vegetative cell, in the form of colony, in maximum temperature (from under 30° to about 42° C.), in their action on gelatin and nitrates, and in other minor features.

The descriptions already published, which cover 88 strains from soils, include 3 atypical cultures. A few other cultures which appear to be nearly related to bacilli of the Pasteuri group were also isolated at the same time but, on account of certain distinctive features, they were excluded provisionally from the group. The delimitation of the Pasteuri group is somewhat indefinite and it seemed desirable to secure additional cultures of closely-related organisms. Accordingly, further isolations were made recently by means of direct plating, earlier work having indicated that this method yields the greatest proportion of aberrant forms. A series of 25 organisms which, in their general characters, approach closely to the Pasteuri group have now been secured and are reported on here. A proportion of them are undoubtedly variants of bacilli which may be classified in the Pasteuri group. Others might deserve to be named and recognised as species if it were shown, after a sufficient number of strains had been studied, that they constitute well-defined types. The number of strains of each type obtained in this investigation is small and, in the meantime, to consider all the organisms as appendages of the Pasteuri group seems to be the only satisfactory method of classifying them. These organisms appear to be much less widely distributed in soils than those which conform definitely to the Pasteuri group. Only two types (nos. 1 and 6) were obtained from more than two different soils. In the following brief descriptions each type is compared with typical members of the Pasteuri group.

1. Non-motile organisms (4 strains). These bacilli were non-motile when examined immediately after isolation, but in other respects three of them cannot be distinguished from strains of B. Loehnisii and the fourth appears to be an asporogenous B. Pasteuri. It has been shown previously (4) that pure cultures of the Pasteuri group may give rise to non-motile variants. Consequently, in the absence of other distinctive features, lack of motility cannot be accepted as having diagnostic importance.

2. Asporogenous organisms (2 strains). One of these strains is certainly a B. Pasteuri and the other is the non-motile organism referred to above. In the Pasteuri group spore formation is readily lost during artificial cultivation and its absence is of little importance. Even when the conditions mentioned on page 365 are provided, the demonstration of spores in certain strains may be a matter of considerable difficulty.

3. Organisms producing a yellow growth (3 strains). This type differs from B. Loehnisii only in producing a yellow pigment on solid media. On agars of different composition the colour of the growth varies from yellowish-grey to golden-yellow or yellowish-brown, and the sediment at the bottom of slope cultures may become reddish when the liquid evaporates. On potato treated with Na_2CO_3 the growth is bright yellow changing to brownish-yellow. Gelatin is liquefied and nitrates are not reduced. All the three strains gradually lost their chromogenic property in artificial culture, and after some months they produced a grey growth indistinguishable from that of B. Loehnisii. The pigment production may therefore be regarded as an unstable modification.

4. Organisms intermediate between B. Loehnisii and B. sphaericus (2 strains). These bacilli are distinguished from B. Loehnisii by developing easily on ordinary neutral media while neither alkalinity nor the presence of ammonia favour their growth. Most strains of B. Loehnisii are capable of proliferating in ordinary media,

but they have difficulty in initiating growth from small inocula, as on sparsely-seeded plates, unless substrates are alkaline and contain ammonia. It is a matter of opinion whether these intermediate forms should be regarded as a variety of B. Loehnisii or as urea-decomposing strains of B. sphaericus Meyer et Gottheil. The latter alternative is perhaps preferable as it does not obscure the limits of the Pasteuri group in which the conditions of growth are of diagnostic importance.

5. Diastatic organism (1 strain). This is another bacillus which grows as easily on ordinary neutral media as on those which are alkaline and contain ammonia. Unlike bacilli of the Pasteuri group it hydrolyses starch and produces slight acidity (about pH 6.3) in glucose bouillon. In its other cultural characters and in its morphology it cannot be differentiated from strains of B. Freudenreichii which reduce nitrates and liquefy gelatin slowly.

6. Organisms which reduce nitrates to ammonia (5 strains). In each of the species of the Pasteuri group there are strains which reduce nitrates to nitrites and others which produce no action on nitrates. The five strains referred to here differ from B. Loehnisii only in reducing nitrates and nitrites to ammonia. It is doubtful if this character is of sufficient importance to justify their separate classification.

7. Small fluorescent organisms (2 strains). These are small rods which usually measure 0.4—0.5×1—3 μ. They produce a greenish fluorescence in suitable media, and as they have no action on gelatin they appeared at first to be a variety of B. putidum. They differed to some extent from that organism in being peritrichous and Gram-positive, and in their inability to grow in media other than those which are alkaline and contain ammonia. After the organisms had been under observation for a considerable time it was found to be possible to elicit spore formation under the conditions described on page 365. The spores are small spherical or slightly ovoid bodies which are slightly thicker than the vegetative cells, and they are formed terminally by bacilli 3 to 5 μ in length. Spores were never observed in large numbers and, as they do not appear early in the development of a culture, their formation might be easily overlooked. Both strains reduce nitrates and nitrites to ammonia and they appear to be closely related to the last type (No. 6) in which all the organisms are likewise of small size. Their other characters are those of the Pasteuri group. In urease activity one of the strains corresponds to B. Pasteuri and the other to B. Loehnisii.

8. Denitrifying organisms (2 strains). These organisms are larger rods (1 μ or more in thickness) than typical Pasteuri strains, and they frequently produce deeply stainable coccoid and ovoid cells which may reach 3 μ in width. Ovoid spores may be formed, but both cultures became asporogenous soon after isolation. "Rough" variants, which grow as slender rods and filaments, may be separated from typical cultures. Both strains bring about denitrification. In their other characteristics they cannot be distinguished with certainty from types of B. Pasteuri which decompose urea rapidly and fail to liquefy gelatin within two months.

9. Organisms producing large cells (2 strains). When freshly isolated these strains produced large cells varying in form from short rods to coccoids. The majority of the organisms measured 1.5×2 μ and they formed spherical spores 1.3 to 1.7 μ in diameter which produced a swelling

of the mother cell in an excentric position. On solid media the growths were tough and adherent, becoming almost white and wrinkled or mammilated. In liquid media the growth consisted of firm granules without any turbidity. The character of the organism gradually changed in artificial culture. The cells became progressively longer and more slender, spore formation disappeared, the growths on solid media became grey, smooth and easily broken up, and in liquid media the organisms produced an uniform turbidity. The large-celled sporulating form of the organism was distinctly unstable. Frequent pasteurisation of spore-containing growths delayed but seemed unable to prevent the transformation. The final form of the organisms could not be differentiated from asporogenous strains of the Pasteuri group. Physiologically they possessed the features of a B. Loehnisii which liquefies gelatin slowly and fails to reduce nitrate. When cultures of the spore-forming organisms were plated the changes described above took place rapidly. Colonies of the smooth type were produced readily, and when these were cultivated further they gave rise to variants which produced thin irregular colonies with a "ground-glass" appearance. The organisms in the latter types of colony were long, non-sporulating bacilli. These observations suggest that, despite the distinctive character of the original cultures, this type of organism may be a growth form of B. Loehnisii.

10. Glucose-fermenting organism (1 strain). This bacillus produces greater acidity (final pH about 5.6) in glucose bouillon and liquefies gelatin more rapidly than any of the bacilli which definitely belong to the Pasteuri group. In its other characters it is indistinguishable from nitrate-reducing strains of B. Freudenreichii.

11. Organism which forms cylindrical spores (1 strain). This is a small bacillus (usually 0.5×2—4 μ) which forms slender cylindrical spores little greater in thickness than the vegetative cells. The spores are formed with equal frequency in all positions in the cell. The organism exhibits a feeble action on urea but it requires alkaline media containing ammonia. Growth on artificial media is scanty. Starch is hydrolysed, nitrates are not reduced, and gelatin is not liquefied. This organism shows rather greater distinction from the Pasteuri type than do the other strains described here.

This series of organisms exemplifies the inherent difficulty in making exact definitions for the classification of bacteria. The only conclusions which appear to be warrantable are that types 1 and 2 belong definitely to the Pasteuri group while, if action on nitrates be disregarded, types 6 and 8 may also be included. The distinguishing characters of types 3 and 9 are probably too unstable to permit of their separation from the group. It seems likely that types 4, 5 and 11 exhibit closer affinities to bacteria other than those of the Pasteuri group. But further evidence is required to show the systematic relationships of most of these organisms.

Bacillus lentus n. sp.

Nine strains of this type were studied. They are identical in all essential respects, and they appear to be sufficiently well defined to justify their recognition as a distinct species.

Morphology. (Plate I, figs. 5 and 6). The cells are comparatively short rods and are frequently bent. They generally measure 0.6—0.7×2—4 μ

in stained preparations. There is little tendency to produce thicker or longer cells, and chains are not formed. Spores, which are generally elliptical, are produced freely. They are variable in size, the largest being about 0.7×1.3 μ. Spores usually develop in an excentric position and they produce a slight swelling of the vegetative cell. Frequently they are formed towards one side of the cell, and their development results in the sporangium becoming asymmetrically distended. Large central spores in fusiform sporangia (one of which is shown in fig. 6) are formed in some cultures.

Motility. The bacilli are motile, but frequently motility is restricted to a few cells in a culture, and it may consist merely of short tumbling movements. The flagella are peritrichous.

Staining. The rods stain uniformly and intensely with aqueous dyes and they retain Gram's stain.

Conditions of growth. Optimum growth occurs in alkaline media containing ammonia, but most strains proliferate easily in ordinary media with a pH of 7—7.5. Growth occurs with difficulty at pH values below 7. Soil extract and the simpler substrates are inferior to media prepared from peptone bouillon. The organisms are aerobes. They decompose urea most rapidly at about 37° C., but the optimum temperature for growth and spore formation is close to 22° C. Cultures on agar remain viable for long periods if protected against evaporation.

Colonies on agar and gelatin. Surface colonies are at first grey but they soon become opaque and almost white. They remain round, flat, glistening, and comparatively small. In some strains they are tough and firmly adherent to the medium. Microscopically they show an entire edge and a featureless interior which soon becomes opaque. Deep colonies are microscopically spherical or discoid.

Agar slope. The growth becomes opaque and grey-white and sometimes tough and adherent, but it remains comparatively thin. It does not spread beyond the inoculated area.

Gelatin stab. The stab growth is thread-like, and a small, non-spreading, grey-white colony develops on the surface. No liquefaction of the gelatin occurs within 4 months in capped tubes.

Glucose agar stab. The stab growth is confined to the upper layers and is thread-like. The surface colony is grey-white and remains small.

Bouillon. A comparatively faint uniform turbidity and later a small amount of sediment are produced. A granular precipitate may be formed on the walls of the tube.

Potato. A visible growth does not appear.

Biochemical characteristics. Milk undergoes no change and no clearing occurs on milk agar. Slight acidity (pH 6—6.3) is slowly developed in glucose bouillon. A similar but still slower change is usually produced in saccharose and lactose media. Starch is hydrolysed. Nitrates are not reduced and indole is not formed. Urea is fermented feebly, 7 days or more being required for the complete decomposition of the urea in bouillon containing 2 per cent of this substance.

Classification. These organisms have not been identified with any previously-described species. Their characters are not greatly different from those of certain strains of B. Freudenreichii, but the cultural characteristics and the action on carbohydrates distinguish the two types, and connecting links have not been discovered. The 9 strains were

obtained from 5 different soils, a result which indicates that they are widely distributed. They constitute a compact group exhibiting uniform characters and little tendency to vary in artificial culture. Accordingly, there appears to be sufficient reason for the recognition of a new species, and the name Bacillus lentus is suggested for this type.

Bacillus fusiformis Meyer et Gottheil.

Two strains of this species were isolated. They are identical with a strain received from Prof. Ford which also produces breakdown of urea. These bacilli exhibit a weak action on urea. They have not been observed to accumulate more than about 2 mg NH_3 nitrogen per ccm in urea bouillon. Adequate descriptions of the species are given by Lehmann and Neumann (12) and by Lawrence and Ford (11), but as the organisms cannot be distinguished morphologically from certain strains of B. Pasteuri and B. Loehnisii the chief differential features will be mentioned. B. fusiformis was found to differ from all organisms of the Pasteuri group by its tendency to spread on the surface of agar, by the production of a brownish, dull, slightly wrinkled growth on the surface of glucose agar stabs, and by its rapid proteolytic action on gelatin and milk. It is further distinguished from all strains of the Pasteuri group, except those which may be regarded as varieties of B. sphaericus, by the ease with which it proliferates on ordinary neutral media and by the rapidity with which cultures exhibit extensive spore formation.

Brunstetter and Magoon (3) mention that they observed dissociation in B. fusiformis, but they give no details of their work, and there appear to be no records concerning the stability of cultures of this organism. Stock cultures of the strains investigated here showed no tendency to change their characters when propagated on agar. It was possible, however, to obtain variants when the organisms were subjected to repeated subculture in milk, or when cultures in other media, which had been incubated for several months at low temperatures, were examined by plating. The variants constitute a continuous series connecting the typical sporing form with a non-sporing type. It will be sufficient, therefore, to refer to the latter. Compared with the sporulating bacillus, the rods are longer and frequently filamentous, and they generally grow in intertwining chains so that growths on solid media are not easily disintegrated. Colonies become ragged in outline but are non-spreading, and they possess a "ground-glass" appearance when examined by transmitted light. The growth on the surface of agar stab cultures does not become wrinkled. The action on gelatin and milk is slower, but this distinction is probably related to the rate of growth. In B. fusiformis urease activity appears to be an unstable character. It disappeared entirely in one of the sporing strains and in its variants. In the case of the other strain this property was lost by two variants which are intermediate in the series, but it was retained by all the extreme asporogenous types which were examined.

Bacillus repens n. sp.

This organism produces a distinctive type of growth on solid media, and it was observed frequently when two soil types were examined by direct plating. It is capable of growing on neutral media which contain neither

urea nor ammonia, and its presence has been noted on plates prepared for the estimation of the total bacterial content of soils when media suitable for that purpose were used. The organism may therefore be of interest for reasons other than its urease activity. Eight strains were investigated in detail. Colonies appearing on plates inoculated with soil, and even the pure cultures, may be mistaken for those of a Proteus or a Zopfii type, and since a tendency to variability was observed in some of the strains, special efforts were made to investigate the production of variants. The description of the organism, as it appeared when freshly isolated, is followed by an account of the variants obtained under laboratory conditions.

Description of Original Cultures.

With the exception of diastatic activity, the 8 strains appear to be identical in all their characters.

Morphology. (Plate I, figs. 1—3). The cells are slender rods with rounded or pointed ends, which usually measure 0.5—0.7×1.5—10 μ in stained preparations. The longer rods (fig. 1) are frequently curved, but the shorter cells (fig. 2) are generally straight. Either of these morphological types may be produced temporarily by a single strain under identical conditions of culture. Short curving chains may be formed, especially in liquid media, and long filaments are not uncommon. Spherical or slightly ovoid spores (fig. 3), which usually measure when mature 0.7—0.9 μ in diameter or 0.7—0.8×0.8—0.9 μ, are formed in a terminal, less commonly in a sub-terminal position. Larger spores are occasionally produced, and many cultures contain a considerable number of very small spores. The smaller spores frequently appear to develop from lateral buds, and may therefore be classified as exospores. Sporulation seldom occurs early in the development of a culture, and usually it is exhibited by only a small proportion of the cells. The heat resistance of the spores is variable. They have been observed to survive exposure at 98—100° C. for 5 minutes but they are generally destroyed in a short time at 90—95° C.

Motility. In young cultures the rods and chains exhibit straight or sinuous movements. The flagella are peritrichous and short. Long rods are furnished with numerous flagella, short rods with few.

Staining. The cells stain uniformly with the usual dyes. They are Gram-negative, but the thickest rods may show a tendency to retain Gram's stain.

Conditions of growth. Alkaline peptone bouillon is a suitable medium. Its value is increased only to a slight extent by the addition of ammonium salts or urea. Growth takes place readily although more slowly at neutrality, but acid media are unsatisfactory. A pH of 6 inhibits multiplication entirely. Soil extract, while capable of supporting growth, is greatly inferior to bouillon. The organism is an aerobe and a psychrophile. It grows well at 20—23° C., but the maximum temperature is under 30° C. Cultures in any medium which permits good growth remain viable for long periods provided desiccation is prevented.

Agar plate. The type of growth is characteristic. Surface colonies are at first thin and grey, and they soon show a tendency to spread. The manner in which they reflect light suggests very fine radial and concentric striation. Microscopically the colonies are finely granular, and bacilli

may be seen spreading outwards on the surface of the agar and forming frequently into rings. Later, when the original colony becomes opaque, the surface of the surrounding medium is covered with almost transparent small daughter "colonies" connected to the parent colony by a very thin surface growth which may be scarcely visible to the naked eye. A microscopic examination at this stage usually shows that the agar has been penetrated by thin, irregular threads which gradually become diffuse. Deep colonies are at first spherical, disc-shaped or ovoid. Later they produce irregular microscopic threads in the medium.

Gelatin plate. Unless a plate is sparsely seeded the medium merely becomes faintly hazy as a result of the formation of microscopic threads in the gelatin and of ring-like growths on its upper and lower surfaces. The gelatin of such plates soon becomes liquefied. When colonies are well separated, each at first appears as a haze which, when examined with a hand-lens, appears to consist of radially-arranged filaments resembling the mycelium of many fungi. Microscopically the colony is found to be growing in the medium and to consist of root-like strands which branch into finer strands and thin threads, any of which may be twisted into spirals. As well-separated colonies become older they frequently possess the naked-eye appearance of a white dust sprinkled on the medium. Microscopically the strands of growth are found to develop swellings of various shapes, the spiral strands become rope-like, and rings of growth appear in the gelatin and on its surface. At this stage the medium soon becomes liquefied. Sometimes when growth occurs slowly and the gelatin has time to concentrate through evaporation, discrete grey colonies may be formed. Microscopically they may be finely granular or they may show a wave-like pattern, and they generally produce some strands and hairs growing into the medium.

Agar slope. The growth on the inoculated area is smooth, glistening and grey, and it becomes opaque. A thin film of growth also spreads over the entire surface of the medium and becomes heaped up at numerous points to form small circular "colonies" which are more transparent than the parent growth. Diffuse growths may penetrate into the agar after incubation for some time.

Glucose agar stab. A thin growth, in which denser areas usually appear, spreads over the surface. In old cultures the surface growth may become thick and brownish-grey. The stab growth is confined to the upper layers in which visible outgrowths may be formed.

Gelatin stab. At first a thin stab growth is produced. This is surrounded by a faint haze in the gelatin, especially near the surface. When examined with a hand-lens the haze is seen to be produced by fine threads. The surface of the gelatin soon becomes densely permeated by threads and begins to liquefy. Small colony-like formations, which are localised swellings of the outgrowths, may appear in any part of the gelatin. A cylindrical liquefaction takes place slowly and a heavy precipitate collects in the liquefied medium. In soft gelatin the outgrowths are thick: in concentrated gelatin their formation may be suppressed.

Bouillon. Growth results in an uniform turbidity and later a greyish slimy sediment which may be dispersed in viscous strings.

Potato. The growth, which frequently fails unless the medium is treated with alkali, is at first yellowish-grey, later brownish-grey and glistening. Occasionally the potato is discoloured.

Biochemical characteristics. Milk is not visibly changed within 2 months. If it is heavily inoculated it may be discoloured or partially curdled after incubation for several months. In bouillon containing glucose or saccharose a slight acidity (pH 6—6.3) is slowly produced. A similar change is brought about in lactose bouillon by one strain only. Starch is hydrolysed by some strains but not by others. Nitrates and nitrites are denitrified. Indole is not formed. Urea is decomposed slowly. In 2 per cent urea bouillon none of the strains ammonify all the urea within 10 days.

Variants of Laboratory Cultures.

Four of the strains have been investigated at different times during a period of four years, and their ability to produce variants which differ from the original cultures has been observed. Most of the results were secured by plating cultures which had been set aside purposely for several months and in some cases for periods longer than a year. Old milk cultures, in which proteolytic changes had started, appeared to be particularly useful. Other methods employed were serial transfer in liquid media and alternate cultivation on potato and in bouillon, the growth from the potato cultures being heated close to the death temperature in the bouillon. Many of the cultures obtained in these ways differed from their parent strains only in the extent to which they formed spores or were capable of spreading on solid media, but three distinctive types of variants were obtained in a stable condition. The latter forms are markedly different from each other, and if their origin were not known it is unlikely that they would be associated in any system of classification. It appears that the distinctions between them are attribut able to differences in morphology which can account for profound modifications in the cultural characteristics of these bacteria. The following descriptions are restricted to the three outstanding variants as those of an intermediate character seem to have little significance. The variants are physiologically similar to their parent strains. Differences in rate of action on gelatin, starch and nitrates were observed, but these may be accounted for by the relative rates of growth. Features not referred to in the descriptions are not significantly different from those of the original cultures.

1. Non-motile Variants.

There are no essential morphological distinctions between this type and the motile organisms other than the absence of flagella in the former. The non-motile variants tend to produce spores in greater numbers and of slightly larger size, but organisms which are motile and yet culturally intermediate between the two types may also produce spores prolifically. The cultural characters to be described show that loss of motility results in the organisms becoming incapable of spreading on agar or of boring through agar or gelatin.

Agar plate. Surface colonies are round or slightly irregular; at first grey and showing a granular appearance by transmitted light; later opaque, grey-white and glistening. Microscopically they are at first very finely granular and they show fine wrinkles in various directions, but ultimately they become opaque. Deep colonies are microscopically compact structures with smooth surfaces.

Gelatin plate. Surface colonies are at first small and transparent, later grey and irregularly round. After about 7 days they sink into the gelatin and disintegrate in the liquefying medium. Microscopically they are at first wrinkled and striated in various directions and, as liquefaction occurs, the margins become diffusely woolly in appearance, but there is no formation of threads in the surrounding medium. Deep colonies are microscopically dense and devoid of hair-like outgrowths.

Agar slope. The growth at first possesses a "ground-glass" appearance when seen by transmitted light but soon becomes thick, opaque, grey and glistening. Whitish streaks frequently develop in the old growth. A thinner marginal zone with an undulate edge spreads slowly outwards but does not progress far from the line of inoculation.

Glucose agar stab. The stab growth is thread-like and scanty. The surface growth is grey and glistening in the early stages but later becomes brownish, dull and wrinkled.

Gelatin stab. The stab growth is thread-like but it usually produces a few short, slender, hair-like outgrowths. A small grey colony forms on the surface but soon sinks into a cup-shaped liquefaction which becomes cylindrical.

Bouillon. An uniform turbidity appears and later a grey, granular sediment which is easily shaken up.

Potato. The growth is glistening and grey, changing slowly to a dull brown, and it usually becomes slightly wrinkled. The potato is generally discoloured.

2. Asporogenous motile Variants.

Among the numerous sub-strains which have been investigated all degrees of spore-forming ability were recognised, and one of the original strains was not observed to produce spores until it had been transferred a number of times on artificial media. Sporulation is therefore a characteristic of the organisms which might pass unnoticed, but several variants were obtained which appear to be entirely asporogenous. They were cultivated repeatedly on suitable agars and on potato, and spores were never observed although the cultures were incubated for several weeks. These organisms are identical with the original strains in every way except in their inability to produce spores. Their chief importance is perhaps the difficulty which their classification would entail if they were encountered in nature, for they exhibit a closer resemblance to B. Zopfii Kurth than they do to the better-known spore-forming bacilli.

Cultures which are intermediate between the asporogenous and the spore-forming types may produce large numbers of coccoid bodies which originate in the terminal position or, less frequently, by the development of small buds on the sides of the rods. These bodies are at first Gram-positive, but later they become unstainable. In the latter condition they appear to possess a very fragile membrane, and their heat resistance is low. Cultures containing considerable numbers of them may be destroyed almost immediately at temperatures between 70° and 80° C. Spherical structures of this type have been described as "regenerative bodies" by Löhnis and Smith (15) who found them to be associated with the acquirement of spore formation in asporogenous bacteria. Efforts were made to confirm the findings of these authors that by means of a series of pasteurisations

increasing in severity it is possible to establish the formation of heat-resistant endospores. In two sets of experiments this procedure raised the death temperature from under 5 minutes at 70° C. to over 5 minutes at 95° C., and one of the resulting cultures was a non-motile spore former. In other tests, however, it failed to increase the heat resistance and, as the organisms tended to produce only vegetative bacilli if they were unheated, it would appear that the coccoid bodies formed by the cultures of an intermediate character may be regarded as abortive spores.

3. Asporogenous non-motile Variants.

Organisms of this type were derived from only one of the original cultures. They differ from the latter in the following respects.

Microscopic characteristics. (Fig. 4). The organisms exhibit pleomorphism to a greater degree than the original strains and they show a greater tendency to grow in chains and to form threads. Cultures may contain a variety of morphological types varying from 0.4 to 1 μ in thickness. Thick ovoid cells frequently become numerous as a culture ages. Motility and spore formation are entirely absent.

Agar plate. Surface colonies are at first small and grey with a granular appearance. Later they show an opaque brownish nucleus surrounded by a thinner, ragged margin consisting of growth in the agar. Microscopically the colonies possess at first a folded-hair structure: later, the dense centre is surrounded by a diffuse growth which penetrates only a short distance into the medium. Threads and twisted growths are not formed in the agar. Deep colonies are identical in microscopic structure with the sub-surface growths of colonies which originate on the surface.

Gelatin plate. Surface colonies are round, raised, grey and glistening, and they always remain small. Microscopically they have a smooth circular edge and a finely granular interior, but at an early stage they become entirely opaque. Liquefaction does not occur. Deep colonies appear irregular or ragged to the unaided eye. Microscopically they are at first spherical but they soon produce short twisted strands which invade the gelatin only in the immediate vicinity of the colony nucleus. The strands gradually develop bulbous swellings so that the final microscopic appearance of the colony is that of a circumscribed cluster of small colonies.

Agar slope. The growth is at first grey and moderately dull and it shows a granular appearance. Later it becomes opaque and grows outwards to a very slight extent with a ragged edge. Spreading does not occur.

Gelatin stab. The cultures resemble those of the original strains but the tendency to form outgrowths from the stab is greatly reduced and liquefaction of the medium is exceptionally slow. In tubes protected against evaporation a small quantity of viscous liquid may be found at the surface of the gelatin after about 4 months.

Classification.

No satisfactory description has been found in the literature which applies definitely to the original strains or to any of the stable growth-forms of this organism. The non-sporing motile variant shows considerable similarity to an unnamed urea-decomposing organism described by Santangelo (18). The same variant also resembles, but less closely, the B. vul-

gare var. Zopfii Löhnis (13) which was considered by Löhnis (14) to be identical with Urobac. Miquelii Beijerinck (1), but the latter organisms produce a somewhat different type of spreading growth on solid media. It seems possible that the motile spore-forming strains may have been confused previously with Bact. Zopfii Kurth. Berlioz (2) described the latter as a spore former which liquefied gelatin slowly, and Swellengrebel (19), in a description which indicates little distinction from the strains described here, stated that it forms spores and decomposes urea. Other writers have found that typical B. Zopfii produces no action on either gelatin or urea. In these circumstances it is suggested that the bacilli characterised here should be recognised as a distinct species which may be named Bacillus repens. The evidence collected in this work indicates that the original strains along with their variants constitute a clearly-defined type.

Bacillus carotarum A. Koch.

One strain of this species was observed to produce a slow action on urea, about 1 mg NH_3 nitrogen per ccm. being produced in 2 per cent urea bouillon in 10 days at 22° C. Urease activity appears to be an unstable character of the organism. The strain just mentioned became entirely inactive towards urea soon after isolation, and a second strain obtained from soil was also incapable of producing the decomposition. The strain which originally decomposed urea exhibited considerable variability in its morphological and cultural characters, and the possibility that this phenomenon was associated with the loss of urea-splitting activity was investigated. Four distinctive and comparatively stable growth-forms were separated from the original culture but none of them was capable of attacking urea. Although the results in so far as they concern urease activity were negative, an account of the variants would appear to be of some general interest, for the cultural characteristics of the bacillus have not been described in detail. In the following descriptions, the organism as it was characterised at the time of isolation is referred to as type 1, while the other variants are only briefly described by comparing them with this form. The method of securing the variants consisted chiefly in plating cultures growing on various media and selecting distinctive colonies, the process being repeated if results were obtained.

Type 1.

Morphology. (Plate II, figs. 7, 8 and 9.) In young cultures the cells are variable in size. They measure 0.8—1.7×1.2—5 μ. They vary in shape from thick ovoid cells which become septate without elongating, to more slender rods, and they frequently occur in twisted and felted chains which may be separated only with difficulty. At an early stage the cells become enlarged (up to 2 μ in thickness) and only faintly stainable. Spores (figs. 7 and 9), which vary greatly in size and shape, are produced readily on solid media. They usually measure 0.8—1×1—2 μ, but they may be larger or smaller. Ovoid spores are formed by the shorter cells and elongate spores by the longest rods. The spore produces no swelling of the sporangium and its position in the cell is variable.

Motility is invariably absent.

Staining. In young cultures the cells are uniformly and intensely

stainable and they retain Gram's stain. The large faintly stainable cells are Gram-negative.

Conditions of growth. The organism is capable of growing in simple media such as a mineral solution containing glucose and $(NH_4)_2SO_4$, but growth is more profuse in ordinary media containing peptone. It is an aerobe, and its optimum temperature is close to 37° C., but growth still occurs rapidly at 22° C.

Agar plate. Surface colonies (plate II. fig. 13) are round, markedly raised, often wrinkled, dull, and almost white. The growth is tough. Microscopically, folded chains of bacilli may be seen in the early stages, but the colonies soon become entirely opaque. Deep colonies are microscopically irregular and very dense, sometimes slightly hairy.

Gelatin plate. Surface colonies are round, white and opaque, and they become ragged in outline as the gelatin liquefies. Liquefaction occurs comparatively slowly. Microscopically the colonies are dense and they possess a rough lobed margin with a tangled hair structure. Deep colonies are white and round or irregular. In microscopic structure they resemble surface colonies.

Agar slope. The growth soon becomes thick, tough, opaque and greyish-white. Its surface is usually wrinkled or mammilated and dull. At a later stage grey and white streaks appear in the growth and its surface becomes smooth and glistening. The tough wrinkled growth is produced by intertwining chains of sporing bacilli. The glistening growth consists chiefly of large faintly stainable cells and it breaks up readily in water.

Glucose agar stab. The stab growth is scanty. The surface growth is at first markedly raised. wrinkled and greyish-white; later thick, smooth and greyish; finally brownish.

Gelatin stab. The stab growth produces, especially from the upper part, numerous short hair-like outgrowths. A small greyish-white colony may form on the surface but soon sinks into a funnel- or cup-shaped liquefaction. As the colony sinks it develops a wrinkled surface and a ragged margin.

Bouillon. Granules or flocculent masses of growth appear at the surface from which they readily sink to the bottom of the tube. The medium remains entirely free from turbidity.

Potato. The growth is at first grey-white, dull and sometimes wrinkled. Later it is luxuriant, smooth, and greyish-pink to reddish-brown.

Biochemical characteristics. Milk is acted upon slowly. After 7 to 10 days at 30° to 37° C. clearing begins at the surface and proceeds gradually downwards. Little precipitation of casein occurs. After several weeks the medium becomes brownish. Acids are not formed from glucose, saccharose or lactose, and indole is not produced. Starch is hydrolysed and nitrates are reduced to nitrites.

Type 2.

Morphology. (Plate II, fig. 10.) Young cultures consist chiefly of long rods which occur in chains, but unsegmented threads are not uncommon. The rods measure 0.7—1×2—10 μ, and they may have flat or rounded ends. The chains and threads do not become intertwined to any extent, and the growths may be broken up easily. At an early stage the

cells become thicker and flat at the ends, and they are then stainable only to a slight degree. Spores are not produced.

Agar plate. Surface colonies (plate II, fig. 14) are grey, glistening and irregular, and they possess a crystalline appearance when examined by transmitted light. Microscopically they show the folded-hair structure typical of B. anthracis. Deep colonies are diffuse to the naked eye and microscopically hairy.

Gelatin plate. Surface colonies are grey and irregular in outline. In the early stages they possess a crystalline appearance, but they become opaque as they sink into the gelatin. Microscopically they at first show a wavy-hair structure; later a diffusely tangled-hair appearance with outlying threads. Deep colonies produce outgrowths visible to the naked eye, and when they become large they resemble fungi. Microscopically they consist of radially-arranged branching strands of threads, but they become diffusely hairy when the gelatin begins to liquefy.

Agar slope. The growth is friable, grey and glistening. At first it is thin and granular; later it becomes thicker and spreads with a ragged margin.

Other features. Characters similar to those which distinguish the colonies and slope cultures from those of type 1 also differentiate the cultures in agar and gelatin stabs and on potato. Type 2 produces an "inverted fir tree" growth in gelatin, and its proteolytic action on gelatin and milk is much slower than that of type 1.

Type 3.

Morphology. (Plate II, fig. 11.) The cells in young cultures are rods with rounded ends which occur singly and measure about 0.7—0.8× 1.5—4 μ. Longer and narrower stainable rods and also thicker faintly stainable forms appear as a culture ages. Ovoid to elliptical spores, which usually produce a slight swelling of the cell towards one end, may be formed, but all the cultures examined became asporogenous.

Agar plate. Surface colonies (plate II, fig. 12) are round and glistening and they become thick, grey-white and opaque. Microscopically they are uniformly finely granular, and the margin is entire. Deep colonies are microscopically dense, irregular, and devoid of outgrowths.

Gelatin plate. Surface colonies are grey and round. Microscopically they are uniformly finely granular, and possess a smooth margin which later becomes lobed. Deep colonies are microscopically finely granular and have smooth surfaces.

Agar slope. The growth is grey and glistening and becomes thick and opaque. It may be disintegrated easily in water.

Other features. The growths on all solid media are smooth and friable. Outgrowths are not produced in gelatin stabs, and bouillon cultures become densely turbid in addition to showing a flocculent growth. In other respects this form resembles type 1.

Type 4.

When this variant is cultivated on agar or gelatin the medium becomes reddish-brown. It is otherwise indistinguishable from type 3.

Relationship of the Variants and Classification.

With the exception of type 4, which was secured on only two occasions, all the variants appeared a great many times during the course of the work. The apparent rarity of type 4 may be attributable to the fact that its colonies on agar cannot be distinguished from those of type 3 unless plates are incubated for a sufficiently long period to permit of colour production becoming evident. Cultures of types 2, 3 and 4 were obtained in a stable condition but type 1, the original form of the organism, was relatively unstable, and periodical plating with the selection of typical colonies appeared to be necessary to maintain its purity. All grades of unstable intermediate forms were also observed and, where plating was not resorted to, the majority of cultures tended to remain intermediate between types 1 and 2 or between 1 and 3. The results are in many respects analogous to those obtained by Nungester (17) with B. anthracis. The essential differences between types 1, 2 and 3 appear to be determined chiefly by morphological distinctions. The tough wrinkled growth of type 1 arises through the formation of twisted and firmly intertwined chains of large cells; the anthracoid growth of type 2 is produced by straight or loop-forming chains of long bacilli; while the smooth growth of type 3 and also of type 4 owes its character to the absence of chain formation. The work of Löhnis and Smith (15), Haag (9), and Lehmann and Neumann (12) has indicated that B. megatherium and other large bacilli are especially prone to change into much smaller organisms during artificial cultivation. The case described here is another illustration of this tendency. In the larger spore-forming bacilli the morphological and cultural characters are frequently most distinctive, but the instability of these features imposes a considerable limitation on their value as criteria for identifying the organisms. If the growth-forms of the bacillus described here are considered as variants about a central type, the organism may be identified as Bacillus carotarum A. Koch. The descriptions of that species given by Koch (10), Migula (16), Gottheil (8) and Lehmann and Neumann (12) contain sufficient information upon which to make a diagnosis.

Summary.

A description and classification is given of soil bacteria which bring about the active decomposition of urea, other than those which may be classified in the Bacillus Pasteuri group or as Sarcina ureae. The following are described: (1) A series of strains exhibiting affinities to the Pasteuri group. (2) Bacillus lentus n. sp. (3) Bacillus fusiformis Meyer et Gottheil. (4) Bacillus repens n. sp. (5) Bacillus carotarum Koch. Descriptions are given of the variants produced by laboratory cultures of the three latter species.

Literature.

1. Beijerinck, M. W., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. S. 33—61. — 2. Berlioz, Précis de bactériol. médicale. Paris 1903. p. 530. (Cited by Swellengrebel. 19.) — 3. Brunstetter, B. C., and Magoon, C. A., Journ. of Bact. Vol. 24. 1932. p. 85—122. — 4. Gibson, T., Journ. of Bact. Vol. 28. 1934. p. 295—311. — 5. Gibson, T., Journ. of Bact. Vol. 28. 1934. p. 313—322. — 6. Gibson, T., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 6. 1935. S. 73—78. — 7. Gibson, T., Journ. of Bact. In the press. — 8. Gottheil, O., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. S. 721—727. — 9. Haag, F. E., Zentralbl. f. Bakt.

Abt. II. Bd. 69. 1926. S. 4—14. — 10. Koch, A., Bot. Zeitung. Bd. 46. 1888. S. 277—287; 308—313; 347—349. — 11. Lawrence, J. S., and Ford, W. W., Journ. of Bact. Vol. 1. 1916. p. 312—314. — 12. Lehmann, K. B. und Neumann, R. O., Bakteriol. Diagnostik. 7. Aufl. München 1927. — 13. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. S. 99—100. — 14. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 14. 1905. S. 714—723. — 15. Löhnis, F., and Smith, N. R., Journ. Agric. Res. Vol. 23. 1923. p. 401—432. — 16. Migula, W., System der Bakterien. Bd. 2. Jena 1900. S. 293—294. — 17. Nungester, W. J., Journ. Infect. Dis. Vol. 44. 1929. p. 73—125. — 18. Santangelo, G., Sperimentale. Vol. 80. 1926. p. 513—519. — 19. Swellengrebel, M. N., Ann. Inst. Pasteur. T. 18. 1904. p. 712—720.

Explanation of Plates.

Figs. 1—11: Preparations from cultures on agar stained with cold aqueous fuchsin. Magnification 1000 ×.

Figs. 1 and 2: Bacillus repens. Two days at 22° C.
Figs. 3 and 4: Bacillus repens. Five days at 22° C.
Figs. 5 and 6: Bacillus lentus. Three days at 22° C.
Figs. 7 and 9: Bacillus carotarum. Two days at 30° C.
Figs. 8, 10 and 11: Bacillus carotarum. One day at 30° C.
Figs. 12 to 14: Colonies of Bacillus carotarum on agar. Two days at 30° C.

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Bavendamm, W., Kultur der am Kreislauf des Schwefels beteiligten Bakterien in **Abderhalden, E.**, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. Abt. XII, Teil 2, Heft 4. 1934. S. 483—546.

Ruschmann, G., Methoden der Silofutterbereitung und Untersuchung. Ebenda. S. 547—663. Preis 9 RM.

Bavendamm ist beizupflichten: Trotz der sehr großen Zahl einschlägiger Arbeiten herrschen über Kultur und Physiologie der Gruppe der Schwefelbakterien noch viele Unklarheiten, wobei betont sei, daß nicht alle am Kreislauf des Schwefels beteiligten Mikroorganismen als „Schwefelbakterien" anzusprechen sind. Diejenigen Bakterien z. B., die aus hochmolekularen organischen Stoffen H_2S frei zu machen vermögen — und ihre Zahl ist sehr groß —, sind nicht einbegriffen.

In seiner Einteilung stellt Verf. die „sulfatreduzierenden Bakterien", unter denen er alle diejenigen anaeroben Bakterien versteht, die Sulfate, Sulfite, Thiosulfate und elementaren Schwefel zu H_2S hydrieren, den eigentlichen „Schwefelbakterien" (Thiobacteria) gegenüber, die Sulfide, Sulfite, Thiosulfate und elementaren Schwefel dehydrieren. Die ersteren werden unterteilt in gewöhnliche Formen, die organische Verbindungen nicht vollständig bis zu $CO_2 + H_2O$ dehydrieren und in polyphage Formen, bei denen die Dehydrierung vollständig erfolgt; von letzteren werden farblose (Leucothiobacteria) und gefärbte Schwefelbakterien (Chromothiobacteria) unterschieden, die ihrerseits weitere Unterteilungen erfahren je nach Farbstoffbildung, Morphologie u. a. Eigenschaften.

Diese gegenüber der früheren (1924) noch erweiterte und verbesserte systematische Anordnung scheint Ref. selbst unter Berücksichtigung der Einwände Rippels gerechtfertigt.

1

2

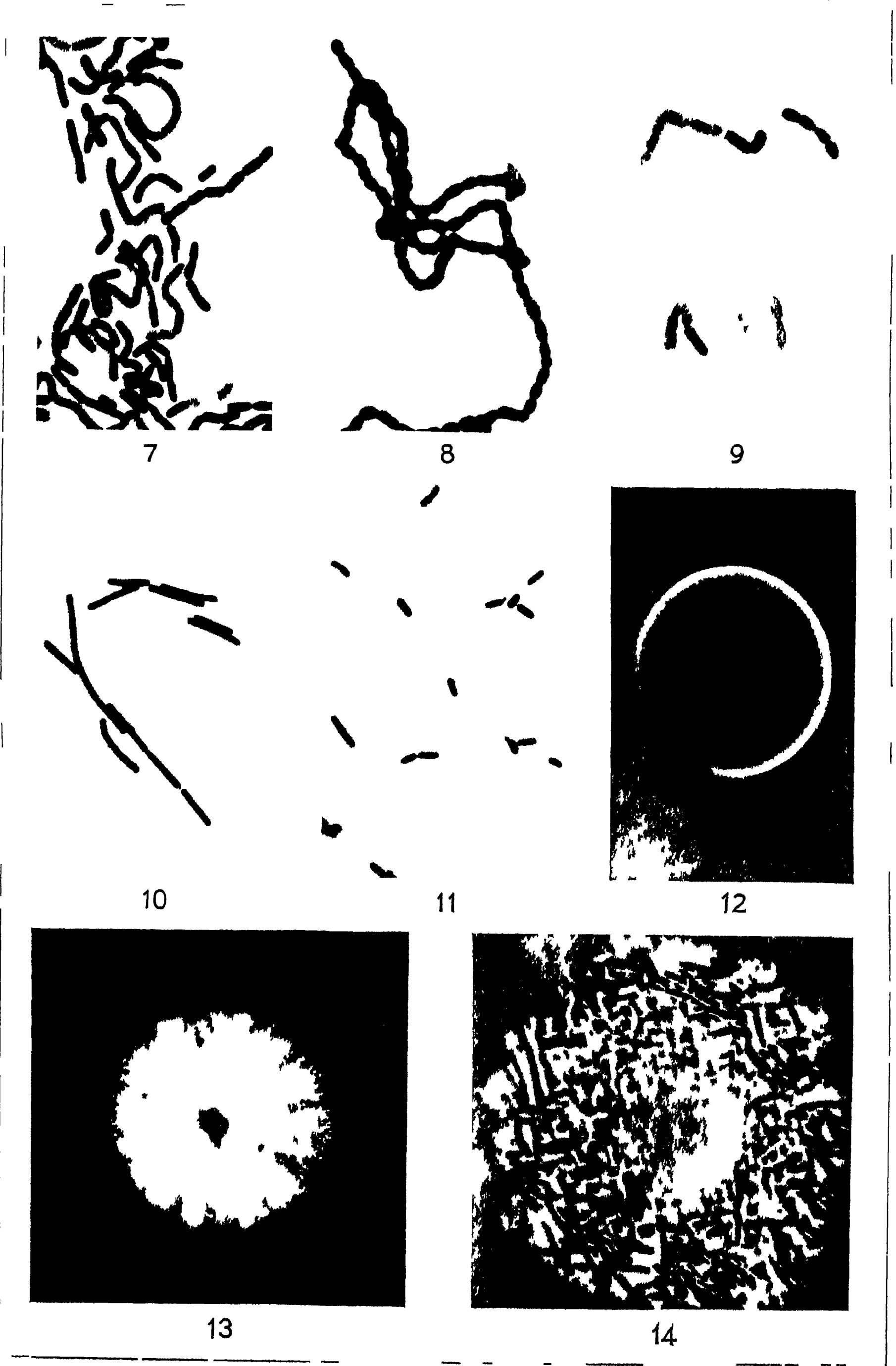
3

4

5

6

Verlag von Gustav Fischer in Jena



Verlag von Gustav Fischer in Jena

Bei der mit Sachkenntnis durchgeführten Besprechung von Anreicherung und Reinzüchtung der Gruppen und Arten im einzelnen werden ausführliche Angaben über Nährböden, Reaktion usw. gemacht, und es werden die vielfachen Lücken aufgedeckt, deren baldige Schließung Verf. von der künftigen Forschung erwartet.

Ruschmann bespricht nach einer kurzen Einleitung zunächst die einzelnen Methoden der Silofutterbereitung, wie das Warm- und Kaltgärverfahren, ferner das Ansäuerungsverfahren bei Grünfutter und Kartoffeln und widmet auch dem „Silofutterbehälter" einen besonderen Abschnitt. Es folgen dann die Methoden der Silofutteruntersuchung, die in chemische und biologische unterteilt sind. Bei den chemischen Methoden nimmt die Säurebestimmung naturgemäß den breitesten Raum ein, dann finden die Bestimmung der [H˙], des Ammoniaks, des Zuckers und des Alkohols Erwähnung. Verf. betont mit Recht, daß die biologische Untersuchung der chemischen nicht nachsteht, sondern diese an Wichtigkeit in manchen Fällen übertreffen wird. Hier sind zunächst die mikroskopischen, dann sehr ausführlich die kulturellen Methoden behandelt. Neben der legitimen wird auch die illegitime Flora des Silofutters berücksichtigt. Hierher gehören z. B. die Buttersäurebakterien, die mit Hilfe des Ruschmann-Harderschen Kartoffelbreis nachzuweisen sind.

Es mutet den Bakteriologen etwas merkwürdig an, wenn zwecks Sterilisierung dieses Breies angegeben wird: „Der Nährboden wird ½ Std. bei 2 Atmosphären im Autoklaven und danach nochmals an 2 aufeinanderfolgenden Tagen je 1 Std. im Dampftopf erhitzt," denn es ist im allgemeinen nicht üblich, im Autoklaven und Dampftopf zu sterilisieren; sofern der Autoklav überhaupt benutzt werden kann, soll er die fraktionierte Sterilisierung im Dampftopf überflüssig machen! Ferner dürfte der Nachweis von Bac. amylobacter gerade bei frischer Anreicherung eher durch die violette bis blaue Färbung der Jogenmassen als durch den Nachweis dunkelbraun gefärbter Glykogenablagerungen in den Sporangien zu erbringen sein.

Nicht unwichtig ist dann das folgende Kapitel „Haltbarkeitsprüfung". Den Schluß bilden „Beispiele chemischer und biologischer Futteranalysen".

In Anbetracht der Wichtigkeit richtiger Ensilagen dürfte der Ruschmannsche Beitrag sowohl vom praktischen Landwirt wie vom Mikrobiologen und Chemiker begrüßt werden. Stapp.

Heinricher, E., Geschichte des Botanischen Gartens der Universität Innsbruck. Jena (Verl. Gustav Fischer) 1934. 36 S., mit 5 Taf. Preis brosch. 3 RM.

Verf. gibt ein anschauliches Bild von den Wandlungen und „Wanderungen" des Innsbrucker Botanischen Gartens (dessen Vorstand er von 1889 bis 1928 gewesen ist) von der Gründung im Jahre 1793 bis zur Jetztzeit. Wir erfahren von den Nöten und Kämpfen um diesen Garten und seinen allmählichen Auf- und Ausbau bis zu der Höhe und Vollkommenheit, die ihm das berechtigte Ansehen in Fachkreisen sicherte. Der Garten erhält noch eine besondere Note durch die landschaftlich so reizvolle Umgebung, was in einigen der sehr gut gewählten Abbildungen beredt zum Ausdruck kommt. Stapp.

Allgemeines und Methodisches.

de Toni, G., Eine neue einfache Methode zum Nachweis säurefester Stäbchen im Zentrifugat. Bemerkungen zur diagnostischen Notiz von G. Wihmann. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 14. 1935. S. 39.)

Die Wihmannsche Methode des Zentrifugierens von Sedimenten entspricht einem Verfahren, das von Dagnini (in Bologna) schon 1906 vorgeschlagen wurde und noch praktischer ist. Als Zentrifugengläschen dienen kleine, beiderseits geöffnete Glaszylinder. Die eine der Öffnungen wird mit einem Gummistöpsel, auf den ein rundes Deckgläschen gelegt wird, verschlossen. Nach dem Zentrifugieren wird die Flüssigkeit dekantiert, der Gummistöpsel entfernt und das auf diesem liegende Deckgläschen abgehoben, fixiert und gefärbt. Der von Trömmer 1923 empfohlene Sedimentator ist nur noch mit einer Skala versehen, sonst kaum von den „Dagninischen Röhrchen" verschieden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Sander, F., Spaltung anorganischer Komplexsalze durch Bakterien und Verwendung dieser Salze zu Differentialfarbnährböden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 465—470.)

Während sämtliche bisher im Gebrauch befindlichen Farbstoffdifferentialnährböden nur auf Oxydations-Reduktionswirkungen einerseits und auf Veränderung der Wasserstoffionenkonzentration des Nährmediums andererseits beruhen (also nur 2 bakterielle Leistungstypen kenntlich machen), handelt es sich bei der Spaltung anorganischer Komplexsalze (die entweder automatisch von einer Farbänderung des Nährbodens begleitet ist oder aber leicht sichtbar gemacht werden kann) um eine andere bakterielle Lebensäußerung. Als für diesen Zweck besonders geeignet erwiesen sich Nitroprussidnatrium in einer Konzentration von 0,01—0,1% (als Indikator für Azetonbildung) und Nickelzyankalium (0,01—0,1%) + Dimethylglyoxim (5 Tropfen gesättigter alkoholischer Lösung auf 5 ccm Kultur). Die Versuche über die Brauchbarkeit der angegebenen Komplexsalzreaktionen zur Differentialdiagnostik innerhalb bestimmter Bakteriengruppen sind noch nicht abgeschlossen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Noble, R. E., and Tonney, F. O., A solid brilliant green lactose bile medium, for direct plating, with results in seventeen hours. (Journ. Am. Water Works Ass. Bd. 27. (1935.) S. 108—119.)

Verff. haben mehrere Rezepte für Herstellung dieses Agars angegeben, von denen Rezept C geschildert sei:

23 g Difco Spezialagar werden in 1 Liter destillierten Wassers gelöst, dann gibt man von folgender Lösung 130 ccm zum verflüssigten Agar: 53,9 ccm Aq. dest., 22,7 ccm 20 proz. Laktoselösung, 19,6 g Pepton (Difco), 14 ccm 0,05 proz. Ochsengalle (Difco), 4,9 ccm 10 proz. Natriumsulfitlösung (wasserfrei), 4,34 ccm 4,25 proz. basischer Fuchsinlösung, 7 ccm 0,001 proz. Brillantgrünlösung, 7,0 ccm 1 proz. Ferrichloridlösung, 1,1 ccm Phosphatpufferlösung (34 g KH_2PO_4 auf 500 ccm Aq. dest., eingestellt auf p_H 7,2 mit 1 m NaOH) und 7,0 ccm 2,2 proz. Erioglaucinlösung (blauer Triphenylmethanfarbstoff). Das Gemisch wird gründlich gemischt, in Erlenmeyer-Kölbchen abgefüllt und 15 Min. bei 1 Atm. sterilisiert. Werden keine 10 ccm der Probe verarbeitet, sondern nur 1,0 ccm und niedrigere Portionen, dann stellt man sich normal starken Agar dadurch her, daß man entweder zu der Impfportion vor dem Gießen 9 bzw. 10 ccm steriles Aq. dest. zufügt oder bei Herstellung des Agars von vornherein 2130 ccm dest. Wassers anstatt 1 Liters verwendet. Bebrütung bei 37° während 17 Std., dann sofort auszählen.

Die Coli-aerogenes-Kolonien sind in der Mitte tiefrot mit einer rosaroten Außenzone, die, je nach Koloniengröße, von einem schmalen Saum bis zu einem 0,45 mm Streifen variieren kann. Der Hintergrund ist gleichmäßig blau. 415 derartige beliebig ausgewählte Kolonien konnten in der

Hauptsache als Coli-aerogenes bestätigt werden. — Beim Vergleich der verschiedenen üblichen Verfahren (unter Anwendung der Butterfield- und Hoskinschen fur flüssige Nährböden bestimmten Auswertungstabellen) ergaben sich folgende Prozentwerte, bezogen auf die mit 100% eingesetzte offizielle Standardlaktosemethode:

Brillantgrungalle-Bouillon (Gasbildung)	Brillantgrungalle-Agar (Koloniezahlung)	Ferrozyanid-Agar (Koloniezahlung)
63,7	66,0	115,1

Daß mit den Brillantgrünnährböden niedrigere Werte als mit der Laktosebouillon herauskommen, bedeutet nur für diejenigen einen Nachteil, die vergessen, daß eine Übereinstimmung mit dem wirklichen hygienischen Befund wichtiger ist als der Erhalt einer möglichst hohen Keimzahl. Der feste Nährboden hat vor dem flüssigen Brillantgrünnährboden die Differenzierungsmöglichkeit der ausgewachsenen Kolonien voraus.

K. J. Demeter (Weihenstephan-München).

Hruszek, H., Über das Wachstum der Pilze durch den festen Nährboden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1934. S. 110—113.)

Es wird eine neue Kulturmethode beschrieben, die die Beobachtung des Tiefenwachstums bzw. des Wachstums der Pilze durch den Nährboden hindurch zu verfolgen gestattet. Die Ergebnisse der bisherigen Untersuchungen sprechen dafür, daß die Tiefenwachstumsgeschwindigkeit zwischen den verschiedenen Pilzen verschieden ist. Die Pilze, die den Nährboden durchwachsen haben, behalten ihre makroskopischen und mikroskopischen Eigenschaften bei. Die Herstellung der Kulturröhrchen erfolgt in der Weise, daß in sterile Reagenzgläschen von geringem Lumen (10—15 mm) entweder die gleiche oder eine von Röhrchen zu Röhrchen steigende Nährbodenmenge mit steriler Pipette eingebracht wird. Hierauf ist sofort die Öffnung des Röhrchens mit einem gut schließenden, sterilen Hartgummistopfen abzuschließen, und die Röhrchen werden umgekippt. Sie werden derart gestellt, daß das vom Stopfen am distalsten gelegene Nährbodenende in leicht schräger Fläche erstarrt, was die Beobachtung des Oberflächenwachstums des durchgewachsenen Pilzes erleichtert. Nach dem Erstarren des Nährbodens impft man auf die obere Nährbodenfläche. Bei Entfernung des Stopfens ist darauf zu achten, daß der Nährboden etwa 1—1,5 cm von der Röhrchenmündung liegen bleibt. Luftdichter Verschluß der Röhrchen mit Gummi- oder Korkstopfen.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virus-Untersuchungen.

Prushanskaja, E., Die Symbiose als rassebildender Faktor bei Mikroben. (Compt. Rend. Acad. Sc. de l'URSS. T. 3. 1934. No. 6. p. 461—467.) [Russisch.]

B. mycoides wurde in Fleisch-Pepton-Bouillon gemeinsam mit anderen Bakterien (B. pyocyaneum, B. proteus vulgaris, Sarcina ureae) kultiviert. Impfung mit diesen Kulturen ergab 4 stabile Varianten von B. mycoides. Die Rasse Nr. 4 bildet glatte, an den Rändern schwach gefaltete Kolonien von bräunlicher Farbe und kör-

niger Struktur. Die Ammonifikationsfähigkeit ist erhöht. Die Zellen sind dünner, von kleinerem Umfang (2—3 μ), stark beweglich und bilden Sporen nach 20—30 Tagen. Die übrigen 3 Varianten waren betreffs ihrer Kultur Übergangsformen zwischen der Ausgangsform und der Rasse Nr. 4. Im Boden verschiedener Gegenden wurden Formen gefunden, die viel Ähnlichkeit mit den gewonnenen Varianten hatten. Die Verzweigung der Kolonien von B. mycoides vermindert sich unter dem Einfluß der löslichen Stoffwechselprodukte der Symbionten — je weiter auf der Petrischale der B. mycoides-Strich von dem B. proteus-Strich entfernt ist, um so stärker tritt die charakteristische Verzweigung auf. Werden B. mycoides-Zellen in einen Tropfen Filtrat von Proteuskultur gesetzt, so bildet sich in denselben allmählich zunehmende Körnigkeit. Im weiteren Verlauf zerfällt die Zellmembran, die Körner werden frei und lösen sich auf. Wachstum dieser kokkenähnlichen Einschließungen wurde nicht beobachtet. A. Imšenecki (Leningrad).

Rochlina, E., Über eine stabile Radiumrasse der Hefe Saccharomyces cerevisiae XII mit amöbenartigen Zellen. (Bull. Acad. Sc. de l'URSS. No. 2—3. 1934. p. 327—334.) [Russisch.]

Eine Petrischale mit Bierwürzeagar wurde ganz mit Sacch. cerevisiae besät. In die Mitte der Schale wurde ein Kapillar mit Radium gesetzt. In der an der Peripherie der sterilen Zone befindlichen Hemmungszone entstanden neue Formen, darunter eine stabile Rasse mit amöbenartigen Zellen. Die Kolonien der letzteren sind größer, als die der Ausgangsrasse und besitzen faltige Ränder. Zahlreiche Ausläufer, die den Zellen ein amöbenartiges Aussehen verleihen, sind unentwickelte Sprosse mit dünner Membran. Die Rasse ist asporogen, in den Zellen bilden sich schnell Öltröpfchen, der Glykogengehalt ist geringer, als beim Ausgangsstamm. Gärungsfähigkeit und Anwachsen der Hefenmasse, wie bei der Ausgangsrasse, indes hat der Gärungstypus der amöbenartigen Rasse Ähnlichkeit mit dem Typus der Untergärung. Zytologische Untersuchung stellte fest, daß das kompakte Chromatin des Kernes der amöbenartigen Zellen mit dem Wachstum der Zelle sich lockert und endlich in unförmige Stollen zerfällt, die sich über die ganze Zelle zerstreuen. In älteren Kulturen werden die Chromatinkörner resorbiert und es entstehen kernlose Zellen. Zuweilen sind 2 amöboide Zellen wie durch einen langen Kopulationskanal, in welchem sich ein Kern befindet, vereinigt. In diesem Fall kann die eine Zelle 2 Kerne enthalten, und die andere ohne Kern sein. Verf. deutet dieses Bild nicht als Kopulationsversuch, sondern als eigenartige Sprossung der amöbenartigen Zellen. A. Imšenecki (Leningrad).

Gildemeister, E. und Neustat, M., Beitrag zur Bakterienvermehrung und zur Bakteriensymbiose. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1934. S. 101—106.)

Mit Hilfe einer von H. Schmidt-Marburg angegebenen Apparatur (Dreihalskolben, durch den ein Cellophanschlauch gezogen ist, der für Bakterien undurchlässig, für wasserlösliche Stoffe aber durchlässig ist), die den Bakterien die Ausnützung einer Nährstoffreserve gestattet, gelingt es, in gleichem Raum wesentlich höhere Keimzahlen zu erzielen, als dies unter gewöhnlichen Versuchsbedingungen möglich ist. Diese Ergebnisse sprechen

dafür, daß bei der Vermehrung der Bakterien Art und Menge der zur Verfügung stehenden Nährstoffe von entscheidendem Einfluß sind und daß die Raumfrage im Sinne von Bail nur sekundäre Bedeutung hat. Diese Tatsache trat auch bei Symbioseversuchen mit der gleichen Apparatur deutlich in Erscheinung. Die antagonistische Wirkung eines Bakteriums beruht anscheinend nicht allein auf seiner schnelleren Wachstumsfähigkeit, sondern im Zusammenhang damit auch auf der Fähigkeit, die Nährstoffe so abzubauen, daß Lebensbedingungen geschaffen werden, die für seine Erhaltung günstig, für die Erhaltung seiner Symbionten dagegen ungünstig sind.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Isabolinski, M. P. und Sobolewa, R. M., Über den Antagonismus der Bakterien. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1934. S. 107—110.)

Coli-, Proteus-, Breslau- und Gärtner-Bakterien sowie Gemische von Staphylokokken und Streptokokken äußerten gegenüber Bac. anthracis antagonistische Eigenschaften, aber nur in lebendem Zustand. Coli wurde mit gleichem Erfolg auch im Tierversuch geprüft.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Besta, B. und Kuhn, H., Untersuchungen über Antagonismus zwischen Diphtheriebacillen und anderen Bakterien. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 520—536.)

Eine Reihe verschiedener Bakterienarten, wie Streptokokken, Pneumokokken, Staph. aureus, Bact. Friedländer, Bact. coli, Bac. subtilis, zeigte einen starken Antagonismus gegenüber Diphtheriebazillen, wenn die Untersuchung nach der Methode von Etinger-Tulczynska ausgeführt wurde, d. h. durch gleichzeitige Einsaat abgestufter Verdünnungen der beiden Bakterienarten in flüssigen Nährboden. Bei Züchtung auf Agarplatten, wobei die Diphtheriebazillen entweder zusammen mit den Antagonisten aufgebracht oder auf Agarplatten ausgestrichen wurden, in deren Tiefe sehr zahlreiche Kolonien des Antagonisten gewachsen waren, kam der Antagonismus nicht regelmäßig oder überhaupt nicht zum Ausdruck. Hier sind offenbar die räumlichen Bedingungen für die Wechselwirkung zwischen den Bakterien nicht gegeben. Auch in flüssigen Nährmedien kommt der Antagonismus nur unter solchen Bedingungen voll zum Vorschein, unter denen die Bakterien sich reichlich vermehren können. Dasselbe gilt für den Antagonismus im Tierversuch. Mit einem Streptokokkenstamm, der sich bei subkutaner Einspritzung im Meerschweinchen rasch vermehrte, konnte die von Cl. Schilling beschriebene Hemmung der gleichzeitig eingespritzten Diphtheriebazillen bestätigt werden. Die Hemmung der Diphtheriebazillen dürfte aller Wahrscheinlichkeit nach auch auf der menschlichen Schleimhaut möglich sein. Es sind bis jetzt jedoch Antagonisten gegen Diphtheriebazillen, die sich im menschlichen Rachen lebhaft vermehren, nur unter solchen Bakterienarten bekannt, die unter Umständen auch pathogene Wirkungen haben.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Jessen, J., Studien über gramnegative Kokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1934. S. 75—88.)

Sowohl bei der Untersuchung frischer Stämme als auch von Laboratoriumsstämmen gramnegativer Kokken sind Kultur- und Vergärungsuntersuchungen von großem Wert. Bei genügender Beachtung der Mög-

lichkeit evtl. vorkommender Variationen geben diese Untersuchungsmethoden eine geeignete und unentbehrliche Grundlage für eine Klassifikation dieser Bakterien ab. Im übrigen ist die Komplementbindungsreaktion (im Gegensatz zu Agglutination) stets verwertbar. — Außer den schon bekannten Arten wird eine bisher noch nicht beschriebene Art besprochen. Diese zeichnet sich aus durch graue durchsichtige Kolonien mit ungleichem Rand und grob granulierter konvexer Mittelpartie, ferner durch die Fähigkeit, außer Glukose und Maltose auch Laktose zu vergären. Serologisch bestanden Beziehungen zu den Gonokokken.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hettche, H. O., Die Wirkung von Fettsäuresalzen auf Erythrozyten und Bakterien. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 83. 1934. S. 506—511.)

Die gesättigten Fettsäuren zeigen mit zunehmender Kohlenstoffzahl eine Steigerung der hämolytischen Eigenschaften. Am stärksten hämolytisch wirken die ungesättigten Fettsäuren. Die Salze dieser ungesättigten Fettsäuren wirken auf grampositive Bakterien stark bakterizid. Ihre Wirkung geht parallel der Zahl der Doppelbindungen. Die Salze der gesättigten Fettsäuren zeigen gegenüber grampositiven Bakterien nur mäßig starke bakterizide Wirksamkeit. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Lehmann, W., Untersuchungen über die Baktericidie des menschlichen Blutes. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 495—506.)

Zur Prüfung der Muchschen Annahme von der spezifisch bakteriziden Wirkung des Blutplasmas wurden Bakterizidieversuche angestellt in Natrium citricum-Plasma und -Vollblut sowie in Hirudin-Plasma und -Vollblut. Die Ergebnisse sprechen gegen die Annahme Muchs. 12 Streptokokkenstämme (hämolytisch) und 10 Pneumokokkenstämme wurden im Citrat-Plasma und -Vollblut schnell vernichtet (durch die Wirkung des Citrates, das Typhusbakterien eher günstig beeinflußte), gelangten dagegen in Hirudin-Plasma und -Vollblut zu starker Vermehrung.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Bauer, A., Über Sporentötung durch Sublimat- und Höllensteinlösungen. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 65—70.)

Bei 20° nur schwache Wirkung des Sublimats auf Sporen (in 5proz. Lösung Abtötung erst nach 12—63 Tagen), besser wirkt Silbernitrat (in 5proz. Lösung Abtötung in Stunden). Durch Zusatz von 33proz. Alkohol wurde bei Höllenstein die Desinfektionskraft erhöht, bei Sublimat herabgesetzt. Höhere Temperaturen steigern die Wirkung des Sublimats wie des Höllensteins in außerordentlichem Maße: 1prom. Lösungen töten bei 100° Sporen in Sekunden (Höllenstein) oder Minuten (Sublimat), bei 60° in 1 Std., bei 37° in Tagen. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Haase, W., Der Einfluß verschiedener Metallverbindungen auf das Wachstum von Bakterien. (Med. Klinik. Jahrg. 30. 1934. S. 1585—1587.)

Es wurden Folien aus Kupfer, Messing, Zinn, Aluminium und Silber (wie sie bei der Wundbehandlung Verwendung finden) auf ihre keimtötende Kraft untersucht. Außerdem wurden die Silberkomplexverbindungen Simanit

und Euthagen zum Vergleich herangezogen. Größere keimtötende Kraft entwickelten nur die Silberkomplexverbindungen. Die Silberplättchen hemmten das Bakterienwachstum in ganz schwachem Grade, die übrigen Metallplättchen so gut wie gar nicht.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Oettel, W., Reiz- und Hemmungswirkungen von Silber und Formaldehyd auf das Bakterienwachstum, nebst Beobachtungen über Wachstumskurven überhaupt. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 71—91.)

Die übliche Auffassung, wonach antiseptische Stoffe nur Hemmung oder Reizung des Wachstums zur Folge haben, ist irrig. Es folgt vielmehr auf jede Wachstumshemmung, wenn sie nicht zum endgültigen Tode führt, eine Reizung und auf jede Reizung eine Hemmung. Das gilt nicht bloß für die untersuchten Antiseptika Silber und Formaldehyd, sondern auch für die „natürlichen“ in den gewöhnlichen Nährböden wirkenden Hemmungs- und Reizstoffe. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Nadson, G. und Stern, K., Über die Wirkung der ultravioletten Strahlen der Quecksilber-Quarzlampe auf die Zellen von Bacillus mycoides Fl. (Compt. Rend. Acad. de l'URSS. T. 2. No. 1. 1934. p. 51—56.) [Russisch.]

Nach Bestrahlung 24stünd. Kulturen von B. mycoides auf Fleisch-Pepton-Agar im Verlauf von 2—3 Minuten mit der Bachschen Lampe bilden sich im Plasma der Bakterien Vakuolen. Veränderungen der Umrisse der Vakuolen weisen auf Erregungszustand des Plasmas. In der zweiten Phase wird das Plasma kleinkörnig und in derselben bilden sich kleine Öltröpfchen. Bei längerer Bestrahlung tritt die dritte Phase ein, die sich durch Auftreten großer Zellen mit unregelmäßigen Umrissen, ferner Zwergzellen und kokkenähnlichen Formen auszeichnet. In einigen Zellen tritt Plasmolyse des Zellinhalts ein, in welchem Fall Schattenformen entstehen. Häufig werden die Zellmembranen aufgelöst und die Zellen vereinigen sich zu einer toten, amorphen Masse, die Ähnlichkeit mit Symplasma hat. Junge Kulturen sind empfindlicher gegen ultraviolette Bestrahlung als alte. Bei kurzandauernder Bestrahlung wird die Sporenbildung beschleunigt, in der zweiten und dritten Phase hingegen verlieren die Zellen die Fähigkeit zur Sporenbildung. A. Imšenocki (Leningrad).

Weinbrenner, K., Untersuchungen über die Bedeutung der bakteriellen Variabilität für die Phagozytose. (Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therapie. Bd. 83. 1934. S. 437—461.)

Bei der Phagozytose von Staphylokokken spielt die Virulenz eine gewisse Rolle. Die Stämme vom Typus aureus, die im allgemeinen Pathogenität besitzen, wurden schlechter gefressen als die Stämme vom Typus albus, die vorwiegend harmlose Saprophyten sind. Bei der Phagozytose von Varianten der Fleischvergifter- und Gärtner-Stämme zeigte sich kein Einfluß der Virulenz, dagegen des Nährbodens, soweit es sich um R-Formen handelte. Auf Salzagar war die Phagozytierbarkeit der R-Formen deutlich gehemmt. Auf alkalischem Nährboden ergab sich für die Staphylokokken optimale Phagozytose. Manche Staphylokokken wurden in Traubenzuckerlösung besser phagozytiert als in physiologischer Kochsalzlösung. Chemisch-physikalische

Vorgänge, wie Oberflächenspannung usw., waren von ziemlich untergeordneter Bedeutung. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Jerusalimsky, N., Die Abhängigkeit des Prozesses der Azeton-Butyl-Gärung von der Art der Stickstoffernährung. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 44—74.) [Russ.]

Je nach der Quelle des Stickstoffs lassen sich 3 Haupttypen der Gärung feststellen. Den ersten Typus bildet die Gärung in natürliches Eiweiß enthaltenden Substraten (Maismaische). In diesem Fall steigen die Vermehrung der Bakterien und die Gärungsgeschwindigkeit mit der Stickstoffkonzentration, bei Überfluß des Stickstoffes hört jedoch die Gärung, infolge der Hemmung durch Stoffwechselprodukte der Bakterien, auf. Der zweite Gärungstypus wird in Gegenwart von Peptonen und Aminosäurenmischung beobachtet, er zeichnet sich durch Aufhören der Gärung am 2. Tage aus, wobei ein großer Rest von unverbrauchtem Zucker übrigbleibt. Im Gegensatz zur Gärung bei natürlichen Bedingungen beschleunigt Stickstoffzugabe über eine gewisse Grenze nicht den Gärungsprozeß. Zugabe von guten Peptonen führt schneller zum Aufhören der Gärung als solche von schlechten Peptonen. Bei schwacher Peptonkonzentration hört die Gärung allmählich auf. Der dritte Gärungstypus wird in Substraten beobachtet, die einfache Stickstofformen (Ammoniumsalze, Harnstoff, einige Aminosäuren) enthalten. Dieser Typus zeichnet sich durch sekundäre Verstärkungen des Gärungsprozesses aus. Die letzteren stehen mit Bakterienvermehrung in Verbindung, die gleichzeitig mit dem Verbrauch von Ammon-Stickstoff beobachtet wird.

A. Imšenecki (Leningrad).

Kanel, E., Milchsäurebildung in der Kultur eines Pilzes aus der Gattung Rhizopus. (Microbiology. Vol. 3. No. 2. p. 259—265. 1934.) [Russisch.]

Der untersuchte Pilz gleicht nach seinen physiologischen und morphologischen Merkmalen am meisten dem Rhizopus japonicus. Auf Kreide enthaltendem Mineralnährboden mit Zusatz von 10% invertiertem Zucker bildet der Pilz im Verlauf von 20 Tagen 38—40% Milchsäure (im Verhältnis zum verbrauchten Zucker) Milchsäure bildet sich auch auf Nährböden mit Stärke, und zwar erreicht ihre Menge 50,9%, übersteigt folglich die Säurebildung auf Mineralnährböden. Bis 20 Tage alte Kulturen enthalten nur Milchsäure, während sich in älteren Kulturen auch Fumarsäure bildet. A. Imšenecki (Leningrad).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Plewako, E. und Tscheboksarow, B., Die Mikroflora des Sirups und ihre Bedeutung für die Schätzung seiner Qualität. (Gärungsindustrie. Nr. 2. 1934. S. 41—48.) [Russisch.]

Die Zahl der Bakterien in 1 g Melasse schwankte bei unmittelbarer Zählung in der Zählkammer von 165—750 Millionen, bei Impfung auf Hefe-Agar von 80—750 000. Dieser Widerspruch ist durch die große Zahl der toten Bakterien zu erklären, ferner durch das Vorhandensein von Bakterien, die auf saurem Nährboden nicht wachsen. Die Melassesorten können in 3 Gruppen geteilt werden: solche, die bis 100 000, bis 500 000 und bis 2,5 Millionen Mikroorganismen auf 1 g enthalten. Die letzte Gruppe wird für minderwertig angesehen. Von sporentragenden Formen wurden zahlreiche verschiedenartige Stämme von B. mesentericus und B. subtilis

gefunden, die teilweise schleimige Kolonien ergaben. Die schleimbildenden Stämme bilden im Hefewasser mit Saccharose in gewisser Menge Alkohol und Azeton.

In der Melasse wurden ferner B. megatherium und B. mycoides gefunden. Sehr verbreitet ist ein sporentragender, unbeweglicher Kokkobazillus, der gelblich-orangefarbige Kolonien bildet, keine Gelatine verflüssigt, keine Milchgerinnung hervorruft und keine Nitrate reduziert. Verff. identifizieren diesen Mikroorganismus mit dem von Cunningham als eine der Übergangsformen der Buttersäure-Bakterien beschriebenen Kokkobazilius. Bei den bei Hefegewinnung bestehenden Entwicklungsbedingungen entwickeln diese Bakterien nur schwache Aktivität und sind daher unschädlich. Nur in sehr seltenen Fällen wurde Bac. macerans isoliert. Bei gemeinsamem Kultivieren von Hefe und sporentragenden Bakterien der Melasse stieg die Gesamtmenge des ausgeschiedenen CO_2, während die Alkoholmenge deutliche Abnahme zeigte. Die Entwicklungsgeschwindigkeit der Melassebakterien ist für verschiedene Arten verschieden, B. subtilis und B. mesentericus ergaben nach 2 Std. 5—20 000 auf 1 ccm, während B. mycoides und B. megatherium nach diesem Zeitraum 45 000 aufwiesen.

Von nicht sporentragenden Formen wurden in der Melasse Milchsäure-Bakterien, Sarcina, Mikrococcus, Leukonostoc und B. coli gefunden. Ferner findet man in großer Menge verschiedene Arten von Saccharomyces, Torulopsis, Mucor, Actinomyces, Penicillium und Aspergillus.

A. Imšenecki (Leningrad).

Iermoljewa, S. und Bujanowskaja, I., Die aromabildenden Mikroben der Heringe und der Salzlake. (Ernährungsfragen. Nr. 3. 1934. S. 73—77.) [Russisch.]

Isoliert wurden B. implexus, B. pseudosubtilis, B. nigricans, B. concentricus, B. iridens, B. amarus Hammer. Diese Mikroorganismen bilden auf Glukosenährböden bis 1% und darüber Azethylmethylcarbinol. Bei Laboratoriumbedingungen erhalten sich die Eigenschaften der aromabildenden Bakterien 6—10 Monate, späterhin bilden sie nur Diazetyl in unbedeutender Menge. Von den isolierten Bakterien verleihen einige den Heringen bei experimentellem Salzen einen eigenartigen Käsegeruch. A. Imšenecki (Leningrad).

Bujanowskaja, I., Die azidophile Mikrobengruppe der Salzlake und der Heringe. (Ernährungsfragen. Nr. 3. 1934. S. 110—113.) [Russisch.]

Aus den Muskeln, dem Eingeweide, den Kiemen und der Haut der Heringe, ferner aus der Salzlake wurden Bakterien vom Typus des B. implexus, B. amarus, B. albuminis, B. pseudosubtilis, B. brunneus, B. concentricus, Lactobac. acidophilus u. a. isoliert. Die Mehrzahl der isolierten Bakterien ist azidophil und vermehrt sich sehr gut auf Nährböden mit 10% NaCl, bei 20% NaCl ist das Wachstum schwächer. Isolierte Kokken und Sarzinen entwickeln sich auf NaCl enthaltenden Nährböden schlecht. A. Imšenecki (Leningrad).

Messing, W., Die Rolle der acidophilen und der aromabildenden Bakterien bei experimentellem Salzen der Heringe. (Ernährungsfragen. Nr. 3. 1934. S. 113—121.) [Russisch.]

Im Fischereigewerbe wurden Heringe mit Zusatz von azidophilen und aromabildenden Bakterien gesalzen. Zusatz der letzteren verleiht den Heringen ihr spezifisches Aroma. Bei Zusatz von Zucker tritt unter dem Einfluß azidophiler Bakterien saure Reaktion der Salzlake ein, wodurch das Verderben der Heringe, sogar bei schwacher Salzkonzentration, verhindert wird. Nach 6 Mon. wurden aus den Tonnen wieder die beim Einsalzen angewandten Mikroorganismen isoliert. A. Imšenecki (Leningrad).

Babitschewa, W., Über die Untersuchungsmethodik der Mikroflora der Fische. (Ernährungsfragen. Nr. 3. 1934. S. 8—16.) [Russisch.]

In der Voraussetzung, daß das Verderben der Fische von psychrophilen Fäulnisbakterien des Wassers abhängig ist, bewahrte Verf. Kulturen von der Haut, der inneren Kiemenfläche und aus den Muskeln der Fische parallel bei Zimmertemperatur (15—20°) und im Thermostat (37°) auf. Es erwies sich, daß Kulturen von frischen Fischen bei Zimmertemperatur sich viel häufiger entwickeln, als im Thermostat. Beim Kultivieren der Bakterien von der Haut und den Kiemen verdorbener Fische war das Wachstum bei verschiedener Temperatur fast gleich. Kulturen aus den Muskeln verdorbener Fische hingegen zeigten bei Zimmertemperatur stets stärkeres Wachstum als im Thermostat. Das Verderben der Fische erfolgt also nicht nur unter dem Einfluß mesophiler, sondern auch psychrophiler Bakterien.

A. Imšenecki (Leningrad).

Ermoljewa, S. und **Bujanowskaja, I.,** Bedeutung des Lysozym für die Aufbewahrung des Kaviars. (Ernährungsfragen. Nr. 3. 1934. S. 69—73.) [Russisch.]

Das aus Hausen- und Sternstörkaviar und aus Eiweiß gewonnene Lysozym besitzt die Fähigkeit, im Kavier befindliche Bakterien völlig aufzulösen oder ihre Entwicklung stark zu hemmen. Nach Durchwaschung des Kaviars mit Lysozymlösung 1 : 10 000 bis 1 : 100 000 nimmt z. B. die Zahl der Mikroorganismen auf 1 g von 1 Million Kolonien bis auf 7 Kolonien ab. Nach dieser Methode konservierter Kaviar läßt sich sehr gut aufbewahren. 22 Tage Aufbewahren bei einer Temperatur von 30° ergibt keine Zunahme der Mikrobenzahl. Bei + 4° C läßt sich der Kaviar bis 18 Mon. aufbewahren. A. Imšenecki (Leningrad).

Tracy, R. I., Spoilage of Olives by Coli bacilli. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 249—265.)

Bei der Konservierung von Oliven entstehen oft Verluste, die nach den Untersuchungen des Verf.s auf eine Infektion mit Bakterien aus der Coli-Gruppe zurückzuführen sind. Die Organismen finden sich als häufige Infektion in den zur Konservierung verwendeten Salzlösungen und an sonstigen Stellen in den Oliven verarbeitenden Betrieben. Sie zeichnen sich durch eine relativ hohe Salzfestigkeit aus. Als natürliche Antagonisten der Coli-Bakterien finden sich in den Konservierungsflüssigkeiten bestimmte Arten von Milchsäurebakterien, durch die nicht allein eine Unterdrückung der Entwicklung der Coli-Bakterien, sondern eine Abtötung künstlich hinzugefügter Krankheitserreger stattfindet. Der Fehler wird in der Industrie als „Fischäugigkeit" bezeichnet, da im Anfangsstadium nur weiße Flecke auftreten, bei weiterem Fortschreiten der Krankheit kommt es dann zur Gasbildung und im Zusammenhang damit zu einer teilweisen Lösung der Epidermis der Früchte. Richter (Kiel).

Smart, H. F., Microorganisms surviving the storage period of frozen-pack fruits and vegetables. (Phytop. Vol. 24. 1934. p. 1319—1331.)

Der Gehalt an Mikroorganismen von 1 g frischen Erdbeeren schwankte zwischen 14 500 und 1 030 000. Nach einjähriger Lagerung bei etwa — 10° C war der ursprüngliche Gehalt um durchschnittlich 99,3% vermindert. Die Kaltlagerung überlebten 1 Hefe-, 7 Pilz- und 5 Bakterienarten. Einige Mikroorganismen überlebten sogar eine 3jährige Kaltlagerung. An frischen Erdbeeren wurden menschliche Krankheitserreger festgestellt, an kaltgelagerten nicht mehr. An kaltgelagerten Brombeeren, Kirschen, Feigen, „logan"-Beeren (Kreuzung Himbeere×Brombeere), Himbeeren und Johannisbeeren wurden im Gramm 50—2250 Mikroorganismen, und zwar 4 Pilz-, 2 Hefe- und 6 Bakterienarten ermittelt. Bakterien menschlichen oder tierischen Ursprungs wurden an gefrorenen Feigen gefunden. Bohnen, Rüben, Mais, Limabohne, Hutpilze, Erbsen, Tomaten und Spinat wiesen nach einjähriger Kaltlagerung 20 bis über 1 000 000 Mikroorganismen auf, und zwar 7 Bakterien-, 2 Hefe- und 8 Pilzarten.

Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Thornton, H. G., and Nicol, Hugh, The effect of sodium nitrate on the growth and nitrogen content of a lucerne and grass mixture. (Journ. Agric. Sci. Vol. 24. 1934. p. 269—282.)

Thornton, H. G., and Nicol, Hugh, Further evidence upon the nitrogen uptake of grass grown with lucerne. (Journ. Agric. Sci. Vol. 24. 1934. p. 540—543.)

In der zweiten Arbeit berichten Verff., daß das italienische Raygrass (Lolium italicum) nach 18 wochenlangem Wachstum mit Luzerne zusammen im gleichen Vegetationsgefäß mit Sand ohne Zusatz von Stickstoffverbindungen etwa 2¼mal so viel Stickstoff enthielt als ohne jegliche Stickstoffernährung. In Verbindung mit dieser Tatsache steht die erste Arbeit. Verff. verabreichten 3 verschiedene Dosen von $NaNO_3$ jeweils nur einmal zur Zeit der Aussaat. Mit 0,33 g Nitrat pro Gefäß enthielt das Gras nach 13½ Wochen 2½mal so viel, und nach 18 Wochen 5½mal so viel Stickstoff als die zugesetzte Menge Nitrat. Mit 1,0 g Nitrat enthielt das Gras nach 13½ Wochen etwas mehr Stickstoff als die ursprüngliche Dosis, nach 18 Wochen 2¼mal so viel Stickstoff. Bei 3,0 g Nitrat war die Menge des Stickstoffs im Grase niemals so hoch als die der Zugabe.

Verff. betrachten die Ausnutzung des von den Luzernearten bzw. ihren Knöllchenbakterien verfügbar gemachten Stickstoffs durch Nichtleguminosen als Tatsache.

Die Wirkung von $NaNO_3$ auf knöllchentragende Luzernepflanzen in Reinkultur (ohne Gras) wurde auch beobachtet. Die gleichen 3 Dosen Nitrat beeinflußten den Gesamt-N in der Grünmasse, sowie die Ausbeute von oberirdischer Trockensubstanz fast gar nicht. Erst in Mischkultur mit Raygras fühlte die Luzerne den Einfluß der Konkurrenz, und bei der höchsten Dosis von Nitrat war die Menge der Luzernewurzeln unterdrückt. Nach Verff. ist eine besondere N-Düngung bei Mischung von Leguminosen und Nicht-Leguminosen zu vermeiden, auch ist kein Gewinn bei N-Düngung von Leguminosen allein zu erwarten. Autorreferat (Rothamsted).

Schädigungen der Pflanzen durch physikalische, chemische und physiologische Einflüsse.

Quanjer, H. M., Enkele kenmerken der „Vergelings"-ziekte van suiker- en voederbieten ter onderscheiding van de „Zwarte houtvaten" ziekte. [Einige Merkmale der Vergilbungskrankheit der Zucker- und Futterrüben zur Unterscheidung von der „Zwarte houtvaten"-Krankheit.] (Tijdschr. over Plantenz. H. 10. 1934. S. 201—211.)

Verf. studierte eine zuerst in der Provinz Zeeland auftretende Krankheit der Zucker- und Futterrüben, wobei die äußeren 3 bis 8 Blätter normal aussehen, die nächstfolgenden 5 bis 10 Blätter gleichmäßig gelb werden (Ostwald-Gelb 1 oder 2, 1927), während die restlichen inneren Blätter schließlich wieder normal sein können. Die Vergilbung schreitet von der Blattspitze an den Rändern entlang fort, dabei die Blattnerven am längsten schonend, so daß diese sich auffallend von dem gelben Mesophyll hervorheben. Mit dieser Krankheit wird oft die als „Zwarte houtvaten"-Krankheit bekannte Verfärbung der Blätter verwechselt, doch beschränkt sich die blaßgrüne Verfärbung auf kleine Flecken zwischen den feineren Nerven, was auf Manganmangel deutet. Infolge der Vergilbung von der Spitze und von den Rändern aus wachsen die Blätter an der Basis und in der Mitte weiter, so daß das Mesophyll an diesen Stellen sich vorwölbt, wodurch die Blätter steif und brüchig werden und beim Doppelfalten unter hörbarem Krachen platzen. Typisch für die Krankheit ist jedoch die krankhafte Änderung des Phloems; die Siebröhren sind mit einer stark glänzenden Masse gefüllt, die Wandungen schwellen auf und das Ganze bildet sich zu einer dunkelgelben, gummösen Masse um (Phloemgummosis). Über die näheren Ursachen der Krankheit ist nichts bekannt. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Demolon, A., and Dunez, A., Nouvelles observations sur la fatigue des luzernières. (Compt. Rend. Acad. Science Paris. T. 199. 1934. p. 1257—1259.)

In einer früheren Arbeit (Compt. Rend. T. 197. 1933. p. 1344) war gezeigt worden, daß man die unter dem Namen Bodenmüdigkeit altbekannte Verminderung der Bodenfruchtbarkeit auf bakteriophage Vorgänge zurückführen kann. Die Versuche der vorliegenden Arbeit mit Luzerne lieferten weitere Beweise hierfür. Luzerne wurde in Gefäßen auf Sand unter sterilen Bedingungen zum Keimen gebracht und sodann mit Bacterium radicicola geimpft. Einem Teil der Gefäße wurde ein bakteriophagenhaltiger Extrakt zugesetzt. Die Zugabe des Bakteriophagen verhinderte die Entstehung normaler Knöllchen an den Wurzeln und damit das Wachstum der Pflanzen. Zwei an Bodenmüdigkeit erkrankte Luzerneböden wurde ebenfalls zu den Versuchen herangezogen. Die Pflanzen entwickelten sich auf diesem nur dann, wenn der Bakteriophag durch vorheriges Trocknen oder Auslaugen des Bodens vernichtet und gleichzeitig durch Impfung für das Vorhandensein von Knöllchenbakterien gesorgt war. Hierbei erwies sich die in Frankreich bisher wenig geübte Samenimpfung als sehr vorteilhaft.

Engel (Berlin).

Vogel, F., Über den Einfluß des Standorts auf das Bitterwerden und die Erträge der Treibgurke. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 14. 1934. S. 61 u. 66—68.)

Die Versuche des Verf.s zeigten, daß eine Ertragssteigerung auf Misterde durch Düngung im Sommer nur bei verstärkter Bewässerung eintritt. Ein vermehrtes Bitterwerden zeigte sich, wenn die Wassergaben über die Norm steigen. Durch verstärkte Bewässerung von gedungtem Boden konnte das Bitterwerden vermindert werden. Bei Verwendung eines Gemisches von tonigem Lehmboden und Torfmull wurden die Erträge durch jede Form der Düngung besonders bei verstärkten Wassergaben gegenüber der Misterde gesteigert. Bitterkeit war kaum halb so viel wie bei Misterde und bei doppelter Wassergabe praktisch bedeutungslos. Das Bitterkeitsprozent war bei Spot resisting bedeutend niedriger als bei Weigels Bester. Im ersten Drittel der Kultur war die Bitterkeit fast bedeutungslos, sie nahm dann bis zum letzten Drittel zu. Starke Lichtwirkung bei gewitterreichen Perioden und langanhaltende intensive Belichtung steigerte das Bitterwerden. Dabei war Wassermangel von größerem Einfluß als die Düngung. Versuche an Früchten mit abgeschnürten, gedrehten oder geknickten Stielen zeigten kein Ergebnis, das eindeutig für die Förderung des Bitterwerdens durch Behinderung der Leitungsbahnen sprach. Winkelmann (Berlin-Dahlem).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Luijk, A. van, Untersuchungen uber Krankheiten der Gräser. Meded. van het Phyt. Lab. Willie Commelin Scholten. H. 13. 1934. S. 1—20, m. 2 Taf.)

Verf. isolierte aus kranken Stellen von Rasen und Golfplätzen mehrere parasitäre Pilze, u. a. Pythium-Arten, Rhizoctonia, Sclerotium und Fusarium spezies, mit denen an Gräsern wie Festuca und Agrostis in Glaskulturen Infektionsversuche angestellt wurden. Dabei erwiesen sich Pythium irregulare Buism., Pythium de Baryanum Hesse, Pythium mammillatum Meurs und Pythium volutum V. et Tr. als stark parasitär, ebenso Rhizoctonia solani K. und Sclerotium spec. Was die beiden letztgenannten Pilze anbetrifft, stellte sich heraus, daß Rh. solani in nicht sterilisierter Erde stärker parasitär wirkte wie in sterilisierter, während bei Sclerotium spec. eben das Umgekehrte der Fall war. Eine Erklarung dafür steht noch aus. Für Pythium torulosum C. et P. wurde eine wachstum- und keimungfördernde Wirkung festgestellt. van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Luijk, A. van, Pythium de Baryanum Hesse em. de Bary. (Meded. van het Phyt. Lab. Willie Commelin Scholten. H. 13. 1934. S. 23—28.)

Eine kurze Besprechung der Nomenklatur dieses Pilzes, anschließend an die Morphologie der aus kranken Gräsern isolierten Stämme.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Nasarowa, E., Infizierung lebender Pflanzen durch Dermatophyten. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 120—137.) [Russisch.]

Vorläufige Versuche auf dem Felde bewiesen, daß Dermatophyten imstande sind, lebende Pflanzen zu infizieren. Weiter wurden vom Verf. Versuche mit Reinkulturen von Trichophyton gypseum asteroides, Achorion Quinckeanum und Microsporum lanosum bei Laboratoriumsbedingungen ausgeführt. Impfungen von Capsella bursa pastoris, Avena sativa, Plantago

und anderen Pflanzen ergaben 70—80% positive Resultate. An der mit Dermatophyten infizierten Stelle bildete sich ein chlorotischer Flecken, der sich im weiteren Verlauf in einen schwarz-grau nekrotischen verwandelte. Das Myzel durchwuchs das Blatt und erschien auf der anderen Blattfläche. Infizierung des Stengels von Phaseolus vulgaris ergab Hypertrophie und Nekrose des Gewebes. Die Entwicklung des Dermatophyten auf Pflanzen erfordert Feuchtigkeit, Fehlen unmittelbaren Sonnenlichtes und eine Temperatur von 18—28° C. Der Umstand, daß die Pilze die Pflanze ohne vorübergehende Verwundung derselben infizieren können, läßt voraussetzen, daß diese Mikroorganismen die Kutikula auflösende Fermente besitzen. Die stärksten pathogenen Eigenschaften wies Achorion Quinkkeanum auf. Von den mit den Pilzen behafteten Pflanzen wurden Retrokulturen isoliert, die ihre pathogenen Eigenschaften für den tierischen Organismus bewahrten. Verf. ist der Ansicht, daß die Dermatophyten Halbparasiten der Pflanzen sind, die von den kranken Pflanzen in den Tierorganismus geraten und sich den neuen Lebensbedingungen angepaßt haben.

A. Imšenecki (Leningrad).

Buisman, Christine J., The area of distribution of the Ceratostomella (Graphium) elm disease. [Die Verbreitungs-Zone der Ceratostomella (Graphium) Ulmenkrankheit.] (Meded. van het Phyt. Lab. Willie Commelin Scholten. H. 13. 1934. S. 35—42.)

Verf.n stellt an Hand der Literatur fest, in welchen Ländern mit Sicherheit bis März 1934 die Anwesenheit von Ceratostomella (Graphium) ulmi nachgewiesen worden ist. Außer in den Vereinigten Staaten ist dies der Fall in den meisten Ländern von Europa. Noch nicht angetroffen wurde die Krankheit in Skandinavien, Dänemark, Estland, Schottland und Spanien. Angaben aus Irland, Ungarn, Litauen, Lettland, Rußland und Griechenland fehlen. Eine ausführliche Literaturliste ist beigefügt.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Oort, A. J. P., Een nieuwe methode ter bestrijding van tarwestuifbrand (Ustilago tritici). [Ein neues Verfahren zur Bekämpfung des Weizenflugbrandes.] (Tijdschr. over Plantenz. H. 9. 1934. S. 185—196.)

Das bisher gebräuchliche Warmwasserverfahren zur Bekämpfung des Weizenflugbrandes nach Appel und Riehm, verbessert nach Jensen, erfordert einen großen Aufwand an Zeit und Arbeitskräften, während eine Schädigung des Beizgutes hierbei nicht ganz ausgeschlossen ist. Verf. arbeitete ein Verfahren aus, welches in kürzerer Zeit sehr gute Resultate ergab. Dazu werden 8 Marmeladegläser von 350 ccm mit je 150 g trockenen Samen beschickt, mit der nötigen Flüssigkeitsmenge vermischt, wasserdicht zugeschraubt und geschüttelt. Sodann werden die Gläser an einem Rade befestigt, das Ganze in ein Wasserbad untergetaucht und mittels eines Motors eine Zeitlang gedreht. Nach Beendigung wird der Inhalt der Gläser in Schalen gestürzt, getrocknet und ausgesät. Eine Warmbenetzungsbeize von 20 l Wasser/100 kg Saatgut während 5—6 Std. bei 45° C ergibt eine vollständige Desinfektion ohne Keimschädigung. Ein Zuschuß von denaturiertem Spiritus in Höhe von 3—5% zur Beize hat sich nicht bewährt.

van Beyma thoe Kingma (Baarn).

Koch, L. W., Investigations on black knot of plums and cherries. II. The occurrence and significance of certain fungi found in association with Dibotryon morbosum (Sch.) T. u. S. (Scientific Agriculture. Vol. 15. 1934. p. 80—95.)

Bei seinen Versuchen zur Isolierung von Dibotryon morbosum aus den durch diesen Pilz verursachten schwarzen Knoten hat Verf. regelmäßig eine Anzahl von Pilzen mitisoliert, von denen er erst annahm, sie könnten das Imperfektstadium zu D. morbosum bilden. Genauere Untersuchungen bestätigten diese Vermutung nicht. Die gefundenen Pilze werden im einzelnen besprochen. Cephalothecium roseum Corda (Trichothecium roseum Link) wurde beständig auf dem Stroma von D. morbosum gefunden. Infektionsversuche zeigten, daß C. roseum als Parasit von D. morbosum anzusehen ist. In Petrischalen wurde ebenfalls die Entwicklung von D. morbosum zum Stillstand gebracht und der Pilz von dem Parasiten überwachsen. Eine Coniothyrium-Spezies, für die zwei verschiedene Stämme nachgewiesen werden konnten, verhielt sich dagegen mehr oder weniger tolerant, vermochte aber leichte Anschwellungen auf den Zweigen von Prunus domestica und P. cerasus zu verursachen und bildete sogar in den vorgerückten Entwicklungsstadien der Knoten reichlich Pyknidien um sie und in den reifen und unreifen Perithezien von D. morbosum. Weiter werden noch eine Monilia- und eine Sphaeronema-Spezies sowie Hendersonula morbosa Sacc. und eine Anzahl anderer Pilze erwähnt. Braun (Berlin-Dahlem).

Gaßner, G. und Pieschel, E., Untersuchungen zur Frage der Uredoüberwinterung der Getreideroste in Deutschland. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 355—392.)

Verff. geben einleitend einen Überblick über unsere bisherigen Kenntnisse von der Teleuto- und von der Uredoüberwinterung. Für die letztere kommen drei Formen in Frage, durch überwinternde Uredosporen, durch überwinterndes Myzel der Uredogeneration, durch die während des Winters fortgesetzte Neubildung von Uredosporen und anschließende Neuinfektionen. Die erste dieser drei Möglichkeiten scheidet unter den klimatischen Verhältnissen Deutschlands von vornherein aus. Von den verschiedenen Getreiderostarten erhalten sich nach den Beobachtungen der Verff. Puccinia glumarum, P. triticina, P. simplex und P. dispersa durch Uredoüberwinterung, und zwar scheinen die beiden letzteren in höherem Maße als die beiden ersteren zur winterlichen Neubildung von Uredolagern und zu Neuinfektionen während des Winters befähigt zu sein. Für P. graminis und für P. coronifera kommt Uredoüberwinterung nicht in Frage, weil Hafer als Winterfrucht bei uns nicht angebaut wird und weil das Sporenbildungsvermögen von P. graminis vorzeitig aufhört und Ausbildung von Uredolagern und Neuinfektionen während des Winters nicht stattfinden. Gefrierversuche mit infizierten Pflanzen zeigten hohe Frostresistenz aller Rostarten. Mit zunehmender Frostresistenz der Sorte nimmt auch die Frostresistenz des Myzels zu. Anderseits ist der Parasit doch empfindlicher als der Wirt, indem die Fruktifikationsfähigkeit des Uredomyzels schon durch Frosteinwirkungen leiden kann, die an Blättern der Wirtspflanze noch keine äußerlich sichtbaren Schädigungen hervorrufen. Feldversuche haben gezeigt, daß epidemisches Auftreten im Früh-

jahr nur möglich ist, wenn eine ausreichende Anzahl von Uredoüberwinterungsherden über die Feldfläche verteilt sind. Diese wiederum hängt auch von der Anfälligkeit der Sorte ab. Schwache Resistenz reicht schon aus, um die winterliche Uredofruktifikation und die Häufigkeit der Sekundärinfektionen deutlich herabzusetzen. Braun (Berlin-Dahlem).

Pieschel, E., Über eine weißsporige Uredoform eines Rostpilzes und über die Entstehung zusammengesetzter Uredopusteln. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 393—408.)

Während bei Hutpilzen verschiedentlich Albinoformen beobachtet worden sind, sind solche bei Rostpilzen bisher noch nicht bekannt. Verf. hat erstmalig eine solche 1931 bei Melampsora euphorbiae (Schub.) Cast f. sp. Pepli W. Müller gefunden, die sich von der Normalform durch völlig farblose Uredosporen und Paraphysen, durch hyaline Keimschläuche und äußerlich durch rein weiße Uredolager unterscheidet. Die Teleutosporen dagegen haben normale Färbung. Die Keimfähigkeit der Uredosporen ist geringer, mit den Teleutosporen ist bisher keine Infektion gelungen. Die Albinoform ist bisher 2½ Jahre im Gewächshaus gehalten worden und hat sich dabei konstant erwiesen. Sie konnte künstlich auch im Freien zur Ausbreitung gebracht werden; ebenso ist ihre Überwinterung beobachtet worden. Durch Mischinfektion mit der Albino- und der Normalform wurden vereinzelte zusammengesetzte Uredopusteln erhalten, die in dem einen Teil weiße, in dem anderen gelbe Uredosporen bildeten.

Braun (Berlin-Dahlem).

Gaßner, G. und Kirchhoff, H., Einige Versuche zum Nachweis biologischer Rassen innerhalb des Roggenbraunrostes, Puccinia dispersa Erikss. und Henn. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 479—486.)

Für Puccinia dispersa ist bisher der Nachweis der biologischen Rassenbildung nicht erbracht, der auch insofern Schwierigkeiten begegnet, als Roggensorten genotypisch nicht einheitlich sind. Verff. haben deshalb Infektionsversuche auf Weizen durchgeführt, auf dem P. dispersa chlorotische und nekrotische Flecken verursacht. Vereinzelt ist auch Uredobildung beobachtet worden. Es konnte auf diesem Wege nachgewiesen werden, daß auch P. dispersa in physiologische Rassen zerfällt, die sich nicht nur durch unterschiedliche Infektionsbilder auf Weizen, sondern vor allem durch verschieden starke Teleutosporenbildung auf Roggen unterscheiden. Braun (Berlin-Dahlem).

Oekologie, biologische und chemische Bekämpfung tierischer Schädlinge.

Chilean Insect parasites for New Zealand. (Nature. Vol. 131. 1933 I. p. 283—284.)

Acaena-Arten sind in Neu-Seeland ein schlimmes Unkraut auf Weiden und verringern durch ihre Kletten den Wert der Wollproduktion um etwa 250 000 Pfund jährlich. Eine Blattwespe in Chile, Antholcus varinervis, nährt sich von Blättern und Infloreszenzen jener Pflanzen. Man hat sie daher in Neu-Seeland eingeführt und erwartet, daß sie keinen Schaden an anderen Rosaceen anrichten wird, da ihre Larve im Winter aktiv ist, wenn außer Erdbeeren die wertvollen Rosaceen nicht genügend Laub haben; Erdbeeren aber werden nicht angegriffen, wenn Acaena zur

Verfügung steht. Die Insekten sind als Vorpuppen in Erde im Kuhlraum transportiert worden. Ferner hat man eine Schlupfwespe, eine Thynnide, Elaphroptera dimidiata von Chile nach N.-S. gebracht, damit sie die Larven der dort so schädlichen „cock-chafers" (Verwandte des Maikäfers) angreife, die kaum einheimische Parasiten haben. Auch nach Frankreich sind diese Parasiten gebracht worden, um dort gegen Melolontha versucht zu werden. K. Friederichs.

Bodenheimer, F. S., Sur la dynamique des fluctuations d'Icerya purchasi Mask. et de Novius cardinalis Muls. (V. Congr. Intern. d'Entomologie, Paris (1932). 1933. p. 89—91.)

Novius, der Feind der Icerya purchasi bringt in jedem Klima, wo beide bestehen können, eine etwa doppelt bis dreimal so große Anzahl von Generationen hervor, als diese und legt überdies mehr Eier. Jeder nicht vorzeitig absterbende Novius verbraucht als Larve etwa 126 Icerya-Eier und als Imago etwa 56 Larven. Theoretisch müßten hiernach 1—2 Novius auf je 100 Schildläuse diese in der folgenden Generation vollständig vernichten. Faktisch aber hat schon ein Zahlenverhältnis von 12—17 Novius auf 100 Schildläuse zur Folge, daß im nächsten Monat ein Minimum des Novius eintritt, ohne daß gleichzeitig auch Icerya auf ein Minimum herabsinkt. Das bedeutet: es gibt ein Optimum des Zahlenverhältnisses beider; mit der Vermehrung der Novius über ein gewisses Maß und dem Abnehmen der Icerya werden die Verhältnisse ungünstig für Novius. Aber seine Fruchtbarkeit und sein starkes Nahrungsbedürfnis bewirken Unterdrückung von Massenvermehrung der Icerya, wenn nicht gewisse nachteilige klimatische Verhältnisse vorliegen. K. Friederichs.

André, M., Notes sur les Acariens observés dans les magasins régionaux de tabacs. (Annales d. Epiphyties. Ann. 19 6. 1933 11. 12. p. 331—355. 10 Abb.)

Es wird zunächst eine Niederschrift von M. Hardy aus dem Jahre 1867 mitgeteilt, in welcher dieser einiges über die Milben der Tabakmagazine in Straßburg berichtet hatte. Sodann bringt der Verf. die eigenen Beobachtungen, die er in elsässischen Tabaksmagazinen gemacht hat. Er hat 1 Glycyphagus-Art und 3 Tyroglyhus-Arten daselbst gefunden, die von den außerdem vorhandenen Cheyletes verfolgt und gefressen werden. Aus der Mitteilung Hardys ist bemerkenswert, daß diese Milben, wie er sagt, im eigentlichen Frankreich am Tabak nicht oder nur schwach vorkommen, im Elsaß dagegen in Menge, weil das Klima hier sehr feucht und der Tabak, besonders in der Nachsaison, daher nur unvollkommen getrocknet sei. K. Friederichs.

Göpfert, E., Zur Kenntnis einiger Raupenparasiten der Forleule, insbesondere der Tachine Ernestia rudis Fall. (Mitt. a. Forstwirtsch. u. Forstwissensch. 1934. S. 102—131, 20 Abb.)

Die Forleulentachine, Ernestia rudis, schlüpft im Mai aus der Puppe, zu der Zeit, wenn die Forleulenraupen schlüpfen. Ende Mai schließt sich die Schlupfwespe Banchus femoralis an, im Juni Enicospilus merdarius. Die Männchen schlüpfen bei allen 3 Arten zuerst aus. Von der bald erfolgenden Begattung bis zur Eiablage vergehen bei

E. rudis rund 25 Tage; sie lebt als Imago 1—1½ Mon.; das Weibchen setzt rund 1000 Larven an Kiefernzweigen ab, die sich, wenn sie Gelegenheit dazu finden, in Eulenraupen beliebigen Alters, meist aber solche des II. oder III. Stadiums, einbohren; sonst sterben sie nach 4—11 Tagen ab, bei hoher Temperatur schneller als bei niedriger. Andere Raupenarten werden als Wirte schwer angenommen, die Aufzucht darin gelang nicht. Man kann nach äußeren Merkmalen nicht immer feststellen, ob eine Raupe gesund oder parasitiert ist. Im letzteren Falle ist ihr Nahrungsbedürfnis gesteigert. E. rudis ist ungleich wichtiger als Eulenparasit im Vergleich zu den beiden anderen. Die Beziehungen der Bevölkerungsdichte von Wirt und Parasit werden dargestellt. Es können 80—90% der Raupen von der Tachine vernichtet werden, manche davon vorzeitig durch Überinfektion (mit 5 und mehr Tachinen), und die Tachine ist somit der stärkste biotische Widerstandsfaktor gegen die Vermehrung der Forleule. Kürzere Mitteilungen betreffen die beiden anderen Parasiten. Hyperparasit von E. rudis und B. femoralis war häufig die Fliege Anthrax merio, selten Anthrax maurus. K. Friederichs.

Clausen, C. P., The natural enemies of Aleyrodidae in tropical Asia. (The Philippine Journ. Science. Vol. 53 3. 1934 3. p. 253—265.)

Die Parasiten und Episiten (Verfolger) von 19 Aleurodiden von größerer oder geringerer wirtschaftlicher Bedeutung sind in einer Liste zusammengestellt. Aleurocanthus woglumi in Cuba und A. spiniferus in Japan werden durch eingeführte Parasiten niedergehalten. Die erstgenannte dieser Pflanzenläuse geht sehr an Zahl zurück in Perioden geringen Regenfalls, während A. citriperdus gerade dann gedeiht und in Regenperioden durch Pilzbefall stark leidet. Arten, die bei Trockenheit gedeihen, geben den Parasiten mehr Gelegenheit zu wirksamem Eingreifen als die anderen. In Hinterindien parasitiert eine große Zahl der Parasiten praktisch jede beliebige Aleurocanthus-Art.

Die Stärke des Auftretens der einzelnen Arten von Aleurodiden an ihren Nahrungspflanzen wird erörtert. Unter den Parasiten ist die Schlupfwespengattung Prospaltella die wichtigste Gruppe, daneben Eretmocerus. Hyperparasiten werden genannt. Coccinelliden als Feinde der Läuse üben nur selten einen mit dem der Schlupfwespen vergleichbaren Einfluß aus. Außerdem fressen Maden der Fliegenfamilie Drosophilidae, Larven von Chrysopiden (Florfliegen) und die Raupen des Zünslers Cryptoblabes gnidiella die Aleurodiden. Diese Raupen sind in Südeuropa Pflanzenfresser, in Ägypten daneben Feinde des „Cotton bollworm" (Earias insulana). K. Friederichs.

Knowlton, G. F., Lizards as a factor in the control of range insects. (Journ. econom. Entom. Vol. 27 5. 1934 10. p. 998—1004.)

Der Staat Utah hat nur sehr wenig pflügbares Land, etwa 85% muß als Weide genutzt werden. Auf den Weiden entziehen phytophage Insekten dem Weidevieh viel von der Pflanzensubstanz, und es würde noch viel mehr Verlust eintreten, wenn nicht die Parasiten und Verfolger aus dem Insektenreich, dazu Reptilien und Vögel den pflanzenfressenden Insekten nachstellten. Verf. hat die Bedeutung der Eidechsen in dieser Hinsicht unter-

sucht, indem er den Mageninhalt vieler Arten feststellte, und er kommt zu dem Ergebnis, daß die Eidechsen der Viehzucht wertvolle Dienste leisten. Eidechsen sind häufig daselbst. Von den größeren kann jedes Tier jährlich mehrere Tausend Raupen, Heuschrecken, kleine Zikaden u. a. beseitigen.

K. Friederichs.

Hampp, H., Blattlausbekämpfungsversuche auf dem Hopfenversuchsgut Hüll 1927—1933. (Allg. Brauer- u. Hopfenztg. Bd. 74. 1934. S. 369.)

Für den praktischen Gebrauch kann nur ein Spritzmittel in Frage kommen, das rasch und sicher wirkt, leicht zu bereiten und billig ist, dazu für die Pflanzen und Dolden unschädlich ist. Es wurden in dem Versuchsgut insgesamt 15 verschiedene Präparate ausprobiert. Ungenügend wirkten die Stäubemittel Chlorbarium und Ri 26, ferner Polvosol. Gut wirkten Seifentabakbrühe und Petroleumseifenemulsion, gut bis sehr gut wirkten transparente Schmierseifenlösung, sehr gut wirkten verstärkte Seifentabakbrühe, Tabakextrakt, Dekalit-S, Contraphin. Die Petroleumseifenemulsion und Tabakextrakt allein ist für die Hopfenpflanze nicht vorteilhaft. Am preiswertesten stellt sich der Hopfenbauer die Spritzbrühe aus transparenter Schmierseife und Tabakextrakt her. Die gleichzeitige Bekämpfung der Blattläuse und der Peronospora hat sich nicht bewährt. Bei der Bekämpfung der Blattläuse müssen die Pflanzen mit viel Spritzmasse gewaschen werden, während bei der Behandlung gegen Peronospora die Flüssigkeit als feinster Nebel auf die Pflanze kommen soll. Heuß (Berlin).

Woglum, R. S., and La Follette, I. R., The double treatment for scale pests in California citrus orchards. (Journ. econom. Entom. Vol. 27 5. 1934 10. p. 978—980.)

Wo die Blausäureräucherung allein in Kalifornien zur Unterdrückung der Schildlausplage in Citrus-Pflanzungen nicht ausreichte, hat man guten Erfolg damit gehabt, auf die Räucherung eine Behandlung mit Mineralöl nebst Schwefel folgen zu lassen. Schwierigkeiten bereitete anfänglich Empfindlichkeit der Bäume gegen Öle von hoher Viskosität. Leichtere Öle müssen angewendet werden in den heißeren und trockeneren Binnenlandtälern, als man sie in kühleren Küstenstrichen gebrauchen darf. Die Behandlung muß zu einem Zeitpunkt erfolgen, in dem am wenigsten Früchte dadurch abfallen, bei Orangen z. B., wenn die vorjährigen Früchte gepflückt und die neuen walnußgroß sind. Ursprünglich wurden Emulsionen angewendet, dann wurde die mechanisch hergestellte Mischung mit Wasser („tankmix“) vorgezogen, und neuerdings wendet man am liebsten lösliche Öle an, die sich am besten auf dem Laub ausbreiten. K. Friederichs.

Kunike, Ein neues wirksames Spritzmittel zur Kornkäferbekämpfung. (Nachrichtenblatt f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 1.)

Verf. konnte feststellen, daß ein aus dem Wollfett gewonnenes Weichfett in Mischung mit 80 Teilen einer 1proz. Seifenlösung eine bleibende Emulsion ergab, mit der Kornkäfer beim Bespritzen mit Sicherheit 100proz. abgetötet werden können. Die Anwendung darf nur für leere Lagerräume erfolgen; auf das Getreide selbst dürfen Wollfett-Seifenlösungen nicht gespritzt werden. Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Zacher, F., Die Kornkäfergefahr in den Malzlagern. (Tagesztg. f. Brauerei. Bd. 32. 1934. S. 514.)

Die Zunahme der Kornkäferplage in den Mälzereien ist nicht nur auf Einwanderung mit ausländischem Getreide zurückzuführen, sondern hauptsächlich eine Folge der Überfüllung der Läger, die die Reinhaltung erschwert. Erstes Prinzip sollte sein, nur desinfizierte Säcke für den Transport von Gerste und Malz zu verwenden. Die restlose Vernichtung des Käfers gelingt nur mit chemischen Mitteln, die übliche Reinhaltung der Böden, Lüftung und Bewegen des Getreides allein genügt nicht, wie vielfach angenommen wird. Jede Malzfabrik sollte die Möglichkeit besitzen, befallene Posten in einem mit Vergasungsanlage versehenen, gasdichten Silo vergasen zu können. An sonstigen Bekämpfungsmaßnahmen kommen geeignete Anstriche und Streupulver in Betracht. Heuß (Berlin).

Trappmann, W. und **Nitsche, G.**, Beiträge zur Giftwirkung von Rotenon und Pyrethrinen auf verschiedene Insekten. (Nachrichtenblatt f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 6—7.)

Auf Grund von Versuchen mit 18 verschiedenen Insektenarten konnten Verff. nachweisen, daß pyrethrinhaltige Spritz- und Stäubemittel stets eine eindeutige Überlegenheit gegenüber rotenonhaltigen Mitteln zeigten. Aus den Versuchen geht gleichzeitig die unterschiedliche Empfindlichkeit der einzelnen Versuchsobjekte gegenüber beiden Giften hervor.
Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Thiem, H., Richtlinien zur Vernichtung der Puppen der Kirschfruchtfliege (Rhagoletis cerasi L.) durch Behandlung des Bodens. (Nachrichtenbl. f. d. Dtsch. Pflanzenschutzdienst. Jahrg. 15. 1935. S. 8—9.)

Bei der Entfernung von wildwachsenden Wirtspflanzen der Larven der Kirschfruchtfliege, insbesondere von Hecken- und Wildkirschen, hat sich zur gleichzeitigen Abtötung der im Boden befindlichen Puppen eine 1proz. Mischung von Tetrachloräthan mit Sapikat oder Ölseife und Wasser bewährt, die in einer Menge von 8—10 l je qm in der Zeit von August bis Mai auf die Bodenoberfläche gegossen wird. Unter Kirschbäumen ist die Behandlung des Bodens nicht zu empfehlen. Der Schädling kann hier billiger und erfolgreicher durch rechtzeitiges Ernten der Früchte bekämpft werden.
Goffart (Kitzeberg b. Kiel).

Hampp, H., Bekämpfung der Erdflöhe mit Naaki im Hopfengarten. (Tagesztg. f. Brauerei. Bd. 33. 1935. S. 41.)

Nach Beobachtungen von G. Nitsche hat sich Naaki zur Erdflohbekämpfung im Kohlgroßanbau sehr gut bewährt, wenn es bereits beim Auflaufen des Kohls angewendet wurde. Bei den Versuchen von Verf. im Hopfengarten war die Wirkung wider Erwarten ungenügend. Dies hängt vielleicht damit zusammen, daß eine gleichmäßige Bestäubung aller jungen Triebe beim Hopfen meist nicht möglich ist, weil das Hervorbrechen der Triebe am Hopfenstock nicht gleichzeitig erfolgt. Die Verhältnisse zur Bekämpfung der Erdflohplage liegen beim Hopfenbau wesentlich anders als beim Kohlbau, wo die Triebe gleichmäßiger kommen und langsamer wachsen.
Heuß (Berlin).

Abgeschlossen am 27. Juni 1935.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 92. No. 20/23.
Ausgegeben am 20. August 1935.

Nachdruck verboten.

Leptothrix echinata, ein neues, vorwiegend Mangan fällendes Eisenbakterium.

[Aus der Biologischen Abteilung der Preuß. Landesanstalt fur Wasser-, Boden- und Lufthygiene, Berlin-Dahlem.]

Von **Herbert Beger.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Anlaßlich von Untersuchungen im Wasserwerk Frankfurt a. d. O., die die obengenannte Landesanstalt ausfuhrte, wurden uns zur mikroskopischen Untersuchung mehrere Wasserproben ubergeben, die grobsinnlich deutlich wahrnehmbare, dicht uber dem Boden schwebende Ausscheidungen in Gestalt dunkelrotbrauner Flockchen enthielten. Nach den erhaltenen Angaben hatte das Wasser wahrend und mehrere Tage nach der Entnahme praktisch nur Spuren von Schwebestoffen enthalten. Diese verzögerte Ausflockung steht in engem Zusammenhang mit der chemischen Beschaffenheit des Wassers, das verhaltnismäßig arm an Eisen und Mangan ist (0,35 bzw. 0,9 mg/l), aber einen relativ hohen Gehalt an organischen Stoffen (rund 30 mg/l, ausgedruckt durch den Kaliumpermanganat-Verbrauch) besitzt. Von Wässern solcher Beschaffenheit ist aber bekannt, daß sich in ihnen die Eisen- und Manganfallung infolge der Bindung des Fe und Mn an Huminsäuren nur langsam vollzieht. Im mikroskopischen Bilde zeigten die Flockchen das in unserer Abbildung wiedergegebene eigenartige und sehr charakteristische Gepräge, d. h. es zeigten sich kleine bräunliche Gebilde von strahlenkugeliger Gestalt, die meist zu vielen locker miteinander vereint, seltener vereinzelt im Gesichtsfelde lagen.

Die nähere Untersuchung dieses Organismus, der sich als ein bisher unbekanntes, vorwiegend Mangan speicherndes Eisenbakterium aus der Gattung Leptothrix erwies und seiner strahlenkugeligen Gestalt wegen als Leptothrix echinata bezeichnet sei, ergab folgende Einzelheiten:

Leptothrix echinata setzt sich bei gut entwickelten Exemplaren aus etwa 20—50 Einzelfäden zusammen, die von einer offenbar sehr kleinen Fußplatte aus allseitig ausstrahlen. Der Kugeldurchmesser beträgt rund (10)—18—20 μ, der der Fäden dementsprechend (5)—9—10 μ. Die Fäden sind stets unverzweigt; jeder von ihnen besitzt nach Auflösung der Vererzung eine gut erkennbare Gallertscheide, in der Zellen von rund 0,4 μ Dicke und 1,0—1,2 μ Länge eingelagert sind. Ob und wieweit auch „Riesenzellen" vorkommen, sei dahingestellt, da die Querwände der Zellen an sich

Fur wiederholte Beschaffung von Material bin ich den Herren Prof. Dr. med. Hans Beger und Dr. Haase, fur die aus den Wasserwerken Hannover dem Erstgenannten zu Dank verpflichtet.

sehr dünn und auch nach Färbung nur schwer zu erkennen sind. Die Fäden stehen z. T. steif, z. T. unregelmäßig gekrümmt ab und sind in der Nähe ihrer freien Enden vielfach leicht korkzieherartig gewunden. Treffen zwei oder mehrere Strahlenkugeln zusammen, so verwirren sich diese gekräuselten Spitzen gegenseitig und die Kugeln ballen sich zu lockeren Flocken. Die Vererzung der Scheiden erfolgt vom Grunde an aufsteigend, so daß die Fäden sich gegen den Scheitel zu allmählich deutlich verjungen. Im Zustand der Vererzung, die besonders am Grunde nicht unbeträchtlich ist, beträgt der Fadendurchmesser am Grunde bis 0,8 μ, am Scheitel in der Regel kaum 0,5 μ. Der Scheitel endet stets stumpf-abgerundet. Eine Vermehrung durch Schwärmer oder Konidien wurde auch in mehrmonatigen Kulturen nicht beobachtet.

Als vererzende Stoffe wurden Eisen und Mangan festgestellt. Das Originalmaterial löste sich in konzentrierter Salzsäure sehr rasch, fiel dabei allerdings auch einer fast restlosen Zerstörung anheim. Mit 10% Salzsäure erfolgte die Auflösung der Vererzung sehr langsam und auch unvollkommen. Wiederholt versuchte Wasserkulturen mit 0,05% Eisenammonzitrat schlugen fehl. Schon nach wenigen Tagen ergab sich ein verwaschenes Bild des Organismus, dem bald ein völliger Zerfall folgte. Auch Agar- und Gelatinekulturen mit Eisen-Ammonzitrat fuhrten zum selben Ergebnis. Dagegen konnte Leptothrix echinata in Manganpepton-Lösungen stets nicht nur leicht und monatelang voll lebensfähig erhalten, sondern auch zur Vermehrung ihrer Kolonien gebracht werden. Zusätzliche geringe Beigaben von Kalziumkarbonat oder Tonerde-Silikaten führten zum mindesten zu keiner Wachstumsförderung.

Überblickt man die von Dorff in seiner jüngst erschienenen Monographie der Eisenbakterien zusammengestellten 9 Leptothrix-Arten, so besitzt unsere neue Leptothrix echinata am meisten Ähnlichkeit mit der von Dorff aufgestellten L. lophoIea. Letztere wird als ein Aufwuchsorganismus beschrieben, der, von einer dicken, bis 5 μ breiten, vererzten Grundscheibe ausgehend, 5—13 selten über 30 μ lange Fäden aufweist. Die Dicke der Fäden beträgt einschließlich der Scheide etwa 1,5 μ, die Zellengröße 0,5 : 1,0—1,3 μ; Riesenzellen sind vorhanden. Die Vererzung ist ergiebig und hält postmortal noch so stark an, daß die ursprungliche Form späterhin kaum noch zu erkennen ist. Diese von Dorff aufgestellte Art ist übrigens bereits vor ihrer Benennung mehrmals abgebildet bzw. beschrieben worden. Bei Lieske finden wir sie in den 1912 veröffentlichten Ausführungen über die Ursachen der besonders 1902—1904 in Dresden aufgetretenen Mangankalamität irrigerweise als Siderocapsa[1])

[1]) Die Gattung Siderocapsa umfaßt einzeln oder zu mehreren bis vielen in gemeinsamer, vererzender Gallerthulle eingelagerte Kleinbakterien von kokkenformiger Gestalt. Wir vermochten von dieser Gattung in einem vorwiegend aus Eisenoxydhydrat bestehenden Absatz einer Filterruckspulung des Wasserwerks Hannover-Elze neben Gallionella ferruginea und Leptothrix trichogenes teils ein-, teils mehrzellige Formen nachzuweisen, von denen zum mindesten die letzteren als Siderocapsa Treubii anzusprechen waren. — Im übrigen sei bemerkt, daß unser mit freundlicher Genehmigung von Herrn Dr. Olszewski-Dresden im Wasserwerk Saloppe durchgeführter Versuch, Leptothrix lophoIea in Ruckspulproben aus den Entmanganungsfiltern gegenwartig ausfindig zu machen, ergebnislos verlief. Vermutlich haben sich die 1902—1904 herrschenden Milieuverhaltnisse durch die seither vorgenommenen Änderungen in der Wasser-Aufbereitung derartig stark geändert, daß sie zum Verschwinden dieses Bakteriums gefuhrt haben. Da es sich also bei den irrtümlicherweise als Siderocapsa Treubii bezeich-

(Treubii?) abgebildet und folgendermaßen beschrieben: „Neben Clonothrix die Hauptursache der Kalamität, in fast allen Leitungsrohren und Hochbehältern, vor allem in der Saloppe-Zone. Von einem zentralen Körper gehen strahlenförmig gekrümmte, bandförmige Fortsätze aus. Bei den Individuen, die anstatt Mangan Eisen gespeichert haben, werden die Fortsätze undeutlich oder fehlen ganz. Der Organismus ist dann nicht leicht zu erkennen.“ Die Art bildete in Dresden, fast ganz rein, einen schwarzen Schlamm oder dunkelbraune Staubteilchen. Die Angaben von Lieske sind später (1914) einschließlich des Lichtbildes von Vollmer übernommen worden. Nach Gärtner trat Leptothrix lopholea (auch bei ihm als Siderocapsa angesprochen) in ganz großer Menge in der Talsperre einer Stadt im südlichen Thüringen auf. Weiter wurde sie auch 1924 von Baylis in der Wasserversorgungs-Anlage von Baltimore als Urheber einer Mangankalamität beobachtet und skizzenhaft-schematisiert, aber gut erkennbar, abgebildet. Eine nähere Beschreibung oder Benennung ist in dieser Arbeit nicht erfolgt. Bemerkenswert erscheint noch, daß unter den in jenem Wasserwerk gegebenen Verhältnissen L. lopholea u. a. zu vielen Exemplaren in gallertige Häute eingebettet, ein ähnliches Habitusbild zu erwecken vermag wie unsere L. echinata, wenngleich bei unserer Art das „Sternenbild“, wie bereits oben erwähnt, lediglich auf einer mechanischen Verkettung der gekrümmten Spitzen verschiedener Strahlenkugeln beruht.

Zwischen Leptothrix lopholea und L. echinata bestehen also nach unseren Darlegungen offensichtlich erhebliche Übereinstimmungen, andererseits aber nach dem Ausweise der beiden oben gebrachten Diagnosen genügend Unterschiede, um die von uns im Wasserwerk Frankfurt a. d. O. aufgefundene Leptothrix echinata als neue und gut begründete Leptothrix-Art in die Wissenschaft einzuführen. In dieser Ansicht wird man noch bestärkt, wenn man beide

	L. echinata	L. lopholea
Fadenlänge	(5) 9—10 μ	20—30 μ
Haftscheibe	nur undeutlich nachweisbar	deutlich, rund 5 μ breit
Fadenzahl	meist 20—50	5 - 13
Zellbreite	0,4 μ	rund 0,5 μ
Zellänge	0,8—1,2 μ	0,8—1,3 μ
Vererzung	gegen den Fadenscheitel deutlich abnehmend, Fäden daher in der Aufsicht lang keilförmig	stark, auch gegen den Scheitel zu sehr deutlich: Fäden daher in der Aufsicht mehr langgestreckt rechteckig

Arten nebeneinander zu beobachten in die Lage kommt, wie es uns bei der Untersuchung einer Filterrückspülprobe aus dem Wasserwerk Hannover-Ricklingen glückte. Leptothrix lopholea erscheint dann als die größere und vor allem weit gröbere Form, Leptothrix echinata als ein viel zierlicherer Organismus. Als Begleiter fanden sich im Wasserwerk Ricklingen in Menge Leptothrix ochra-

neten Mg-Fällern in Wirklichkeit um Leptothrix lopholea handelt, so darf man auch gewisse „Mangan-Kalamitäten“, die mit Leptothrix lopholea zusammenhängen, nicht als „Siderocapsa-Kalamitäten“ bezeichnen.

cea und L. trichogenes, sehr vereinzelt auch Gallionella ferruginea.

Im Wasserwerk Frankfurt a. d. O. wurde Leptothrix echinata ursprünglich, wie oben erwähnt, in abgezapften Reinwasserproben angetroffen. Bei einer von uns später vorgenommenen eingehenden Untersuchung konnten wir feststellen, daß diese Art in dem belufteten, uferfiltrierten, aber noch nicht weiter aufgearbeiteten Rohwasser nicht vorhanden war, wohl aber Leptothrix discophora (L. crassa), L. ochracea und L. trichogenes, Gallionella ferruginea und G. minor, sowie vererzte Langstäbchen, deren systematische Eingliederung zur Zeit aber noch nicht ratsam erscheint, ferner Aphanothece-artige Gebilde, die an die von Dorff beschriebene Aphanothece ferriglobula erinnerten und eine in kleine Eisenhofe eingeschlossene Lagynion-Art. Im Ruckspulwasser des Enteiseners wurde die Hauptmasse der Eisenbakterien durch Leptothrix ochracea gebildet, der spärlich Leptothrix discophora und Gallionella ferruginea, sehr vereinzelt unsere Leptothrix echinata, Gallionella minor und wiederum vererzte Haplobakterien beigemischt waren. Das Rückspulwasser der Entmanganungs-Anlage schien zunächst sehr arm an Eisenbakterien. Von den aus dem Enteisener genannten Formen traten, wenn auch mengenmäßig ganz wesentlich spärlicher, Leptothrix ochracea und L. discophora auf, letztere mit bis 12,5 μ dicken Scheiden. Hingegen war der Filterkies zumeist mit stark vererzten Gallerthüllen uberzogen. In diesen wurden nach sorgfältiger Behandlung mit Salzsäure z. T. die kurzen Fäden des eigenartigen und bisher noch immer sehr ungenau bekannten Mycothrix clonotrichoides und ferner flächenartig verbreiterte Bakterienklumpen sichtbar, die am ehesten einer Siderocystis-Art angehoren dürften. In Kulturen mit Manganpepton, die wir mit diesem Filterkies ansetzten, entwickelte sich später spärlich u. a. auch unsere Leptothrix echinata. Auch in Wasserproben, die wir späterhin zu untersuchen Gelegenheit hatten, trat diese Art nie mehr in der Menge und Reinheit auf wie in unseren Ausgangsproben. Immerhin dürfte es von Interesse sein, daß sich durch diese nachfolgenden Untersuchungen die Zahl der bei der Eisen- und Mangan-Ausfällung beteiligten Formen noch um Crenothrix polyspora (sehr spärlich), den Flagellaten Anthophysa vegetans und das in seiner systematischen Einordnung noch völlig ungeklärte Ochrobium tectum vermehren ließ. Die Untersuchung dieses einen Wasserwerks führte also nicht nur zur Auffindung eines neuen Eisenbakteriums, sondern zum Nachweis von weiteren 12 mor-



Abb. 1. Leptothrix echinata nov sp. Habitusbild vieler zu einem Flockchen vereinigter Exemplare. Original[1]). Vergr. rund 200 ×.

[1]) Die Anfertigung der Aufnahme verdanke ich Herrn Prof. Dr. Tiegs-Berlin.

phologisch bestimmbaren Eisen- bzw. Manganfällern, unter denen der Feststellung von Mycothrix clonotrichoides und Ochrobium tectum allgemeinere Bedeutung zukommt[1]).

Zum Abschluß unserer Ausführungen sei noch kurz zu einer Auffassung Stellung genommen, die sich im neuesten Schrifttum über das Vermögen der Eisenbakterien, Eisen und Mangan zu fällen, anzubahnen scheint. Daß die Fähigkeit, sowohl Eisen als auch Mangan niederzuschlagen, einer ganzen Anzahl von Eisenbakterien zukommt, ist zwar auf Grund zahlreicher Untersuchungen und Beobachtungen als feststehend zu betrachten, doch erscheint die aus diesen Befunden gezogene Verallgemeinerung, daß alle sog. „Eisenbakterien" dieses Vermögen besitzen, nicht berechtigt. Bedeutsam in diesem Zusammenhang dürfte sein, daß der im Vorjahre verstorbene Führer der Eisenbakterienforschung, Einar Naumann, in seiner „Technischen Limnologie" bei der Definition des Begriffes „Eisenbakterien" der Möglichkeit einer Manganspeicherung mit keinem Worte gedenkt und auch den Begriff „Manganbakterien" nicht aufführt, ferner, daß auch Dorff[2]) in seiner „Eisenbakterien"-Monographie ohne jegliche Bemerkung den von Beijerinck untersuchten Bacillus manganicus aufgenommen hat, obgleich von diesem die Fähigkeit einer Eisenfällung — zum mindesten bis jetzt — unbekannt ist[3]). Beide genannten Autoren scheinen dementsprechend kein spezifisches Wahlvermögen bei der Fällung von Eisen und Mangan anzunehmen. Dem stehen nun nicht nur eine Reihe von physiologischen Untersuchungen über die Ansprüche einzelner Arten entgegen, sondern auch zahlreich vorliegende und täglich zu erweiternde praktisch-ökologische Beobachtungen, die als richtungsweisend betrachtet werden können. So ist bekannt, daß z. B. Arten wie Siderocapsa coronata und S. Treubii neben Eisen auch reichlich Mangan zu speichern vermögen, daß Leptothrix discophora in Manganlösungen auffällig stark vererzte Scheiden bildet, daß in erster Linie die Gattung Crenothrix — und zwar besonders die Cr. fusca — für viele der unangenehmen Mangan-Kalamitäten verantwortlich zeichnet und endlich daß — wie wir oben gezeigt haben — die Dorffsche Leptothrix lopholea dieselbe Rolle spielen kann. Auch unsere neue Leptothrix echinata zählt zu den vorwiegend Mangan fällenden Organismen, vielleicht sogar zu denen, die ohne Mangan überhaupt nicht auszukommen in der Lage sind. Auf Grund des vorliegenden Tatsachenmaterials und unter Berufung auf die Ausführungen von Winogradsky glauben wir daher in der Auffassung nicht fehl zu gehen, daß sich die gemeinhin als „Eisenbakterien" bezeichneten Eisen- und Manganfäller bei einer Aneinanderreihung der einzelnen Arten so gruppieren lassen, daß an dem einen Flügel die nur als Eisenspeicherer bekannte Gal-

[1]) Beiläufig sei hier bemerkt, daß wir bei der Untersuchung von Material aus der Peene bei Anklam (Pommern) als Besiedler von grobpflanzlichem Detritus des Flußbodens neben Leptothrix discophora mehrfach auch die durch ihre Tracht unverkennbare, aber bisher nur aus Leningrad und Sakrow bei Potsdam bekannt gewordene Leptothrix pseudovacuolata (Perf.) Dorff (Spirothrix pseudovacuolata Perf.) auffanden.

[2]) Bezeichnend ist, daß Dorff auch in der Zusammenstellung der nichtbakteriellen „Eisen"organismen eine ganze Reihe von Arten aufführt, die bisher nur als Manganfäller bekannt geworden sind.

[3]) Auch Lieske schreibt 1926: „Alle Eisenbakterien sind imstande, außer Eisen auch Mangan zu speichern, und zwar ist in allen Fällen deutlich zu beobachten, daß das Mangan ein üppigeres Wachstum hervorruft."

lionella ferruginea, auf den anderen Flügel der nur Mangan speichernde Bacillus manganicus zu stehen kommt. In diesem so umgrenzten Fe-Mn-Spektrum wären die übrigen Arten entsprechend ihren spezifischen, ökologisch-optimalen Ansprüchen so einzugliedern, daß die mehr siderophilen Arten dem Gallionella-Flügel, die manganophilen dem Bacillus manganicus-Flügel zu nähern wären. Beispiele für die letzteren haben wir bereits oben erwähnt. Eine offensichtlichere Siderophilie weisen dagegen von den häufigeren Arten z. B. Leptothrix ochracea und noch mehr L. trichogenes auf. Auch die Siderococcus-Arten dürften hierher zu stellen sein.

Zusammenfassung.

In zwei norddeutschen Wasserwerken wurde u. a. ein neues, in die Verwandtschaft von Leptothrix lopholea Dorff zu stellendes Eisenbakterium, Leptothrix echinata, aufgefunden, das durch seinen strahlenkugeligen Bau gut charakterisiert ist und vorwiegend Mn speichert. Die Feststellung dieser offensichtlichen Mn-Vorliebe bietet eine neue Stütze für die Auffassung von Winogradsky, daß sich die Eisenbakterien nach dem Fe-Mn-Spektrum gliedern lassen.

Schrifttum.

Baylis, I. R., Manganese in Baltimore water supply. (Journ. Amer. Water Works Assoc. Vol. 12. 1924. p. 211.) — Dorff, P., Die Eisenorganismen. In: R. Kolkwitz, Pflanzenforschung. Bd. 16. 1934. — Gartner, A., In: Besprechung über die zur Verbesserung des Dresdener Wasserleitungswassers zu treffenden Maßnahmen, abgehalten am 3. Sept. 1912 im Ratssitzungssaale. 125. Ratsdrucksache. Dresden 1912. S. 50. — Lieske, R., Untersuchungen über das Auftreten von Mangan und Eisen speichernden Bakterien in der Wasserleitung der Stadt Dresden. 125. Ratsdrucksache. Dresden 1912. S. 7. — Lieske, R., Lehrbuch der allgemeinen Bakterienkunde. 1926. — Naumann, E., Technische Limnologie. In: E. Abderhalden, Handbuch der biol. Arbeitsmeth. Abt. IX. Bd. 8. 1931. — Vollmar, O., Die Entmanganung des Grundwassers im Elbtale und die für Dresden ausgeführten Anlagen. (Journ. f. Gasbeleuchtung u. Wasserversorgung. Bd. 57. 1914. S. 944.) — Winogradsky, S., Eisenbakterien als Anorgoxydanten. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 57. 1922. S. 1.)

Nachdruck verboten.

Über eine neue autotrophe und thermophile Schwefelbakteriengesellschaft.

[Aus dem Pflanzenphysiologischen Institut der Deutschen Universität Prag.]

Von V. Czurda.

Mit 3 Abbildungen im Text.

Die eigenartige Erscheinung der biologischen Schwefelabscheidung (siehe bereits Nathansohn 1902, Stephenson 1930) in thiosulfathaltigen Lösungen sind in ihren Bedingungen und in ihrem Ablauf zum Teil noch recht unklar. Es wurde danach gestrebt, Vertreter der verschiedenen dazu befähigten Gruppen für eine neuerliche Untersuchung heranzuziehen. Dies schien nötig und zweckmäßig, weil Bakterien mit der Fähigkeit zum Thiosulfat-Abbau und zur Schwefel-Abscheidung von verschiedenem ökologischen Verhalten und verschiedenen chemischen Leistungen bekannt sind.

So gibt es azidophobe, nur in Medien von p_H 8,0—10,0 gedeihende Vertreter Thiobacillus thioparus Beijerinck (Nathansohn 1902), Th. denitrificans Beijerinck (Beijerinck 1904) sowie der von Trautwein (1921) untersuchte Organismus und azidophile, nur in Medien unterhalb p_H 6,0 tätige Vertreter, Th. thiooxydans Waksman (Waksman und Joffe 1922) und Th. thermitanus Emoto, Th. lobatus Emoto, Th. crenatus Emoto, Th. umbonatus Emoto (1933).

Noch ungeklärt ist die schon von Nathansohn, Trautwein und Klein und Limberger (1923) an den azidophoben Thiobacillus-Arten bemerkte Tatsache, daß die Schwefel-Abscheidung nur in der Rohkultur, also beim Zusammenwirken mehrerer Bakterienarten, nicht aber in der Reinkultur stattfindet. Auch die Rohkulturen zeigen bei nachweisbarem Thiosulfatverbrauch nicht immer eine gleichbleibende Schwefel-Abscheidung. Besonders auffallend ist aber die Tatsache, daß die von Emoto untersuchte azidophile Art (Th. thermitanus) niemals Schwefel ausscheidet, obgleich die schon anfangs saure Reaktion der Lösung (p_H 5,5) durch weitere Schwefelsäurebildung außerordentlich ansteigt (bis unter p_H 1,0). Da unter gleichen Reaktionsverhältnissen in vitro aus Thiosulfatlösungen Schwefel von selbst ausfällt, müssen hier besondere Umstände im Spiele sein, die dahin wirken, daß das Natriumthiosulfat quantitativ zu Schwefelsäure oxydiert wird, ohne daß Schwefelbildung stattfindet.

Neben der Isolierung thermisch mesophiler, azidophober Thiobacillus-Arten (z. B. Th. thioparus, Th. denitrificans) wurde auch eine solche azidophiler, thermophiler Arten aus dem Formenkreis des Thiobacillus thermitanus angestrebt.

Das Studium verschiedener, auf das Vorkommen von Vertretern der letztgenannten Gruppe untersuchten „Schwefelquellen" in Südmähren, in der Slowakei, in den Karpathen und im Tatragebiet, ergaben, daß im Abfluß des hochtemperierten sulfatischen Thermalwassers von Pystian (60 bis 67° C im Brunnen) eine besonders eigentümliche, bestandbildende Orga-

nismengesellschaft vorkommt, deren Komponenten zum Teil wenigstens der gesuchten Gruppe angehören oder ihr wenigstens sehr nahe stehen. Über die Eigenartigkeit der Organismengesellschaft sei im folgenden vorläufig berichtet.

Von den chemischen Analysen des Thermalwassers sei die von Hynie 1933 erwähnte, im Jahre 1930 vorgenommene angeführt, um seine Zusammensetzung zu kennzeichnen.

1 kg des Mineralwassers enthalt:

Kationen	mg	Anionen	
$K^{\cdot}$	13,94	NO_3'	1,096
$Na^{\cdot}$	77,85	Cl'	111,7
$Li^{\cdot}$	0,359	Br'	0,413
$Ca^{\cdot\cdot}$	218,8	I'	0,072
$Sr^{\cdot\cdot}$	2,506	SO_4''	519,7
$Mg^{\cdot\cdot}$	44,32	HPO_4''	0,215
$Fe^{\cdot\cdot}$	0,084	HCO_3'	269,0
$Mn^{\cdot\cdot}$	0,018	H_2S''	0,909
$Al^{\cdot\cdot\cdot}$	0,147		1.261,261
		HBO_2	3,143
		H_2SiO_3	58,7
			1.332,0
		CO_2 freies	217,1
		H_2S freies	3,514
			1.544,0

In 100 ccm des Gases aus dem Brunnen Trajani sind enthalten:

CO_2	10,5 ccm
CH_4	17,8 ,,
O_2	0,0 ,,
N_2	71,7 ,,
	100,0 ccm

Unter diesen Zahlen fällt der hohe Sulfatgehalt und das Fehlen von organischer Substanz auf. H_2S ist nur in geringen Mengen vorhanden. In der den Sulfatgehalt charakterisierenden Zahl ist sicherlich auch die Menge verschiedener, an der Luft und bei der chemischen Analyse nicht beständigen anderen Schwefelverbindungen enthalten, welche von großer biologischer Bedeutung sein dürften. Für das Zutreffen dieser Vermutung sind inzwischen von Cherbuliez (1934 a u. b) Tatsachen beigesteuert worden.

Ein Teil dieses Thermalwassers wird über einen Rieselturm geleitet, damit es belüftet und gekühlt werde. Infolge der Verbauung des Geländes ist, soweit ich sehen kann, der Rieselturm der einzige Ort, wo es in den verschiedenen Abschnitten des Temperaturgefälles zur Ausbildung einer makroskopisch sichtbaren Organismengesellschaft kommt, welche an das erinnert, was von anderen Schwefelquellen beschrieben worden ist (siehe Literatur bei Emoto 1933). Im Temperaturgefälle von etwa 42° C abwärts[1]) sind die mächtigen Blau-Algenbestände bemerkenswert. Sie führen eine reiche Auswahl der verschiedensten Organismen (Bakterien, Diatomeen und Grünalgen). Stellenweise finden sich dazwischen ganze Ansammlungen von Beggiotoa-Arten und vereinzelte Chromatium-Zellen. In dem darüber befindlichen, noch völlig algenfreien Stockwerk des Rieselturmes, im Temperaturgefälle zwischen 48—58° C, sind die Verteilungs-

[1]) Zuverlässige Temperaturzahlen können bei der reichen Gliederung in kleine, ökologisch stark untereinander abweichende Lebensräume mit gewöhnlichen Thermometern nicht gewonnen werden.

rinnen, Rinnsaale und Abflußflächen von gelblichen Schwefel-Abscheidungen bedeckt. Der Schwefel ist kristallisiert ausgeschieden. Der Schwefelschlamm, welcher sich an strömungsfreien Stellen absetzt und die in der Strömung flutenden, von Schwefelkristallen durchsetzten, schleimigen Fetzen zeigen eine üppige Bakterienflora, in der ein Organismus, ein dickes Spirillum, durch seine Gestalt und Häufigkeit auffällt. Dazwischen können zahlreiche zarte und dicke Stäbchen sowie vereinzelte Actinomyces-artige Fäden beobachtet werden. Während das kleinzellige Material nur durch kulturelle Analyse, welche weiter unten besprochen wird, zerlegt werden kann, ist das Spirillum schon morphologisch gut gekennzeichnet.

Es ist ein 1,2—2,0 μ dickes, 14—22 μ langes, leicht zu einem Schraubengang gekrümmtes Stäbchen. Die Färbung des in üblicher Weise vorbereiteten Ausstrichpräparates mit Karbolfuchsin ergibt eine schwache rote Färbung des Zelleibes, in welchem eine große Zahl tiefblauer kugeliger Inhaltskörper nahezu von der Größe des Zelldurchmessers gelagert sind. Es scheinen die gleichen Kugelchen zu sein, welche oft in lebenden Zellen beobachtet werden konnen. Die Spirillen befinden sich in dichten Beständen auf den schleimigen Massen der Stromungsstellen einseitig festgeheftet vor. Durch Geißelbewegung des anderen Endes führen die Zellen eine ständige langsame, kreiselnde Bewegung des freien Zellendes aus. Die als Unterlage dienenden Schleimmassen rühren offenbar von einem kleinen Stäbchen her, welches später unter Thiobacterium Nr. 1 beschrieben wird. Im Schwefelschlamm der strömungslosen Stellen finden sich die Spirillen in häufiger Teilung, aber völlig unbeweglich vor. Da ein thermophiler Organismus von den oben aufgezählten Eigenschaften noch nicht bekannt zu sein scheint, schlage ich im Hinblick auf den Fundort vor, ihn als Thiospirillum pistiense n. spec. zu bezeichnen (s. Abb. 1).

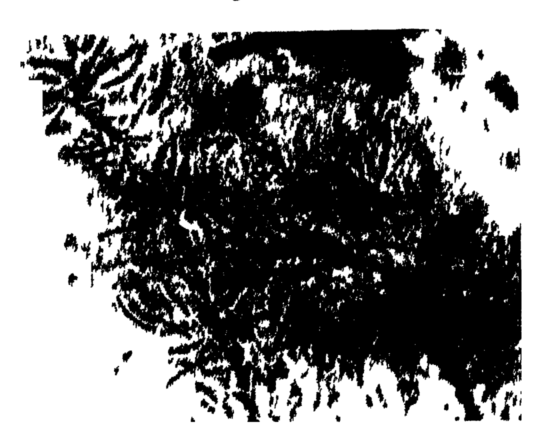


Abb. 1. Natürliches Vorkommen des Thiospirillum pistiense n. spec. Schleimstränge mit eingelagerten Schwefelkristallchen und aufsitzenden Spirillen. Aufgenommen mit Leica-Mikroaufsatz und Trockenobjektiv 40× im lebenden Zustand; auf zwei Drittel verkleinert.

Die bisherige Beobachtung hat ergeben, daß es zur Ausbildung dieser Organismengesellschaft erst kommt, wenn die Ausflußtemperatur von mehr als 60 auf 58° C gesunken ist. Entsprechend den jeweiligen Temperaturverhältnissen beginnt das Organismenleben bald in größerer, bald in geringerer Nähe des Ausflußrohres des Thermalwassers.

Da auch die Schlammlager auf natürliche Weise durch die aus dem Untergrund aufsteigenden „Thermalwässer“ (s. Hynie 1933) und auf künstliche Weise, durch Zuleitung von Thermalwasser unter seinem Einfluß stehen, wurden auch sie auf ihren Gehalt an Vertretern der Gruppe untersucht.

Die makroskopische Untersuchung am Ort ergab nirgends eine sichtbare Entwicklung von Organismen. Es konnten weder mikroskopisch noch durch Anreicherungskulturen solche Organismen gefunden werden, deren Vorkommen erwogen worden ist (Kořínek s. Hynie 1933), nämlich schwefelführende Purpurbakterien, Algen, Sulfatreduzierer der Gruppe Microspira desulfuricans. Daher mußte zum Nachweis die kulturelle Analyse mit Hilfe synthetischer Nährlösungen herangezogen werden. Mit ihnen wurde auch eine Analyse des oben erwähnten kleinzelligen Organismengemisches des Thermalwassers vorgenommen.

Dazu bediente ich mich zunächst einiger, schon von anderer Seite für ähnliche Zwecke benutzter Lösungen bzw. der entsprechenden Agarnährböden, und zwar

1. Waksmansches Medium Nr. 6 bestehend aus

$(NH_4)_2SO_4$	0,02%
$MgSO_4$	0,05%
$CaCl_2$	0,025%
KH_2PO_4	0,3%
$FeSO_4$	0,0001%
S (Schwefelblume)	1,0%

Die Nährlösung, welche nach der Sterilisation einen p_H-Wert von durchschnittlich 5,0—5,4 (Cavalier-Glas) aufgewiesen hat, ergab meist keine entsprechende Anreicherung von irgendwelchen Bakterien. Auch die mit der nächstgenannten Lösung reingezüchteten Bakterienstämme, sowie die auf natürlichen alkalischen oder neutralen Schwefel-Abscheidungen vorkommenden Bakteriengesellschaften konnten in dieser wiederholt versuchten, sterilisierten (!) Nährlösung nicht oder nur zu einer unbefriedigenden Vermehrung gebracht werden.

2. Emotosche Lösung bestehend aus:

$Na_2S_2O_3$	0,5%
$MgCl_2$	0,01%
NH_4Cl	0,01%
$CaHPO_4$	0,5%
KH_2PO_4	0,3%

Die Lösung bzw. der mit Zusatz von 2% Agar hergestellte feste Nährboden stellt eine Modifikation der Waksmanschen Lösung Nr. 10 dar, die Emoto nach Ersatz des tertiären Ca-Phosphates durch das sekundäre zur Kultur und Isolierung von Thiobacillus-Arten aus japanischen Thermalquellen verwendet hat. Diese Lösung bzw. Agarnährboden mit einer Reaktion von p_H rund 5,2—5,4 (Cavalier-Glas) ergaben weit bessere Erfolge als die Waksmansche Lösung mit elementarem Schwefel.

3. Trautweinsche Lösung bestehend aus:

$Na_2S_2O_3$	0,2%
$MgCl_2$	0,01%
KNO_3	0,1%
Na_2HPO_4	0,02%
$NaHCO_3$	0,1%

Nach der Sterilisation im Cavalierglas p_H rund 9,0. Durch Zusatz von 2% Agar wurde aus dieser Lösung ein fester Nährboden bereitet.

Während die oben genannte thermophile Bakteriengesellschaft des Thermalwasser-Abflusses nach eigenen Untersuchungen keine meso- und thermophilen Fäulniserreger als Begleitkeime enthält und daher direkt zum Isolieren der Komponenten herangezogen werden konnte, wurden die Schlammproben wegen ihres verschieden hohen Gehaltes an solchen Keimen

nicht unmittelbar für die Isolierungsarbeiten verwendet. Von ihnen wurden in den oben genannten Lösungen zunächst Anreicherungskulturen angelegt und diese in 2—3 Passagen von 5—8tägiger Dauer fortgeführt, ehe das darin befindliche Keimmaterial für einen Plattenguß oder Ausstrich verwendet wurde. Die Bebrütung der Kulturen geschah bei 48, 40 und 22° C. Schon die Anwendung der beiden höheren Temperaturstufen in Verbindung mit den beiden erstgenannten Lösungen hat an dem Keimmaterial der Schlammproben eine starke auswählende Wirkung gezeigt. Alle heterotrophen Keime, welche in der Trautweinschen Lösung bei 22° C noch durch mehrere Passagen fortkommen, bleiben in den beiden höheren Temperaturstufen besonders in der Emotoschen Lösung restlos aus. Was darin noch nachweisbar bleibt, ist nach den bisherigen Feststellungen C- und N-autotroph oder wenigstens mixotroph. Das in den Anreicherungskulturen vorhandene Zellmaterial wurde durch Ausstrich und Plattenguß auf Grund der Zellbeschaffenheit, Kolonieform und Säurebildung in seine Komponenten zerlegt. Von ihnen wurden verschiedene Stämme isoliert, um ihre biochemischen Leistungen näher zu prüfen.

Von den auf diese Weise aufgefundenen Gliedern der Organismengesellschaft seien vor allem die bis nun nachgewiesenen thermophilen Komponenten der Biocoenose kurz beschrieben.

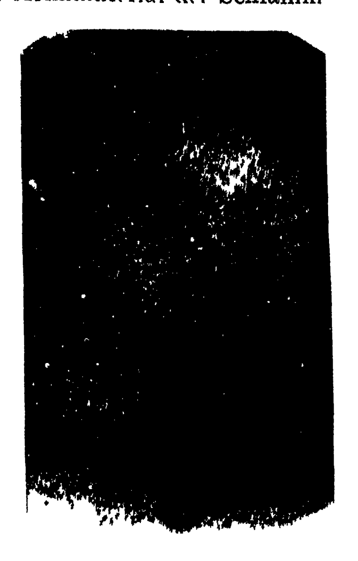


Abb. 2. II. Verdünnungsstufe aus einem Kochschen Plattengußverfahren mit Agar nach Emoto am 7. Kulturtag bei 48° C. Zur Aussaat (I. Verdünnungsstufe) gelangte eine Öse der Kulturflüssigkeit der 2. Passage einer Anreicherungskultur in Emotoscher Lösung von Schwefelschlamm des Rieselturmes (Vers. R. 63 ab.). Um gewisse Kolonien Höfe durch Auflösung des $CaHPO_4$. Leica-Nahaufnahme 1 : 3 bei seitlicher Beleuchtung; auf zwei Drittel verkleinert.

Thiobacterium Nr. 1.

Es ist ein ungefähr 0,5 μ breites, etwa 1 μ langes, lebhaft bewegliches, gramnegatives, aerob gut gedeihendes Stäbchen, welches auf dem Agar nach Emoto zu kleinen, kreisrunden, ganzrandigen, anfangs weißlichen, später bräunlichgrauen Kolonien, bei 48° C in 5 7 Tagen, heranwächst. Die von den Kolonien während dieser Zeit gebildete Säure löst das im Agar suspendierte $CaHPO_4$ in rundlichen Höfen auf, welche sich noch nach dem Aufhören des Kolonienwachstums vergrößern (s. Abb. 2). Mit der Auflösung des Ca-Phosphates geht später eine Kristallbildung einher.

Nach diesen Feststellungen handelt es sich um ein Bakterium, welches dem Thiobacillus[1]) thermitanus Emoto nahe steht. Es ist von diesen sowie allen übrigen bekannten Thiobacterium-Arten dadurch unterschieden, daß unser Th. Nr. 1 auf dem genannten Agar

[1]) Nach der Einteilung von Lehmann und Neumann müssen die bisher allgemein als „Thiobacillus" bezeichneten Arten (thioparus Beyer., denitrificans Beyer., thiooxydans Waksman, thermitanus Emoto, lobatus Emoto, crenatus Emoto, umbonatus Emoto) Thiobacterium genannt werden, weil die Sporenbildungsfähigkeit allen diesen Arten fehlt.

bei 48° C rascher wächst als bei niederen Temperaturen, wogegen Th. thermitanum auf dem gleichen Substrat schon bei 37° C keine Vermehrung mehr zeigt (s. dazu noch Emoto 1933, S. 417). Im natürlichen Thermalwasser zeigt dieser Organismus noch bei 58° C Vermehrung. Bei 22° C ist Vermehrung und Säurebildung stark gehemmt. Die Fortzüchtung bei dieser Temperatur schlägt oft schon in den ersten Passagen fehl. Bei 48° C gedeihen hingegen einige Stämme dieser Art in Reinkultur bereits 22 Passagen ohne merkliche Veränderungen.

Ein weiterer Unterschied besteht zwischen den beiden Organismen Th. Nr. 1 und Th. thermitanum darin, daß mein Stamm in der Emotoschen Lösung mit primärem Ca-Phosphat an Stelle des sekundären sich nicht vermehrt und Thiosulphat nicht abbaut, während Th. thermitanum darin zur gleichen Säurebildung befähigt ist wie bei Anwesenheit des sekundären Salzes.

Eine Abscheidung elementaren Schwefels außerhalb der Zellen ist bisher in keiner Lösung gesehen worden.

Allmähliches Austrocknen auf dem Substrat verträgt das Bakterium auch bei Ausschluß der Säurewirkung nicht. Damit dürfte das völlige Fehlen im Schlammpulver für Kompressen im Zusammenhang stehen.

Auf Grund der Keimzahlbestimmungen bildet dieses Thiobacterium den Großteil der kleinzelligen Bakterienflora im Schwefelschlamm des Thermalwassers. Dieses ist es offenbar auch, welches die oben erwähnten Schleimmassen im Abfluß des Wassers bildet; wenigstens ist es in Reinkultur zur Ausbildung schleimiger Oberflächenhäutchen befähigt. Es wird ferner in allen Schlammproben angetroffen, welche bis zur Probenentnahme unter dem Einfluß des heißen Thermalwassers stehen (Schlammbehälter der Badehäuser, Cratoquelle, Versandschlamm Pi-Qua). Vermißt wurde es trotz wiederholter Prüfungen im Schlamm des Waag-Nebenarmes und Kompressen-Schlammpulver, in verschiedenen Faulschlämmen und Ackerböden.

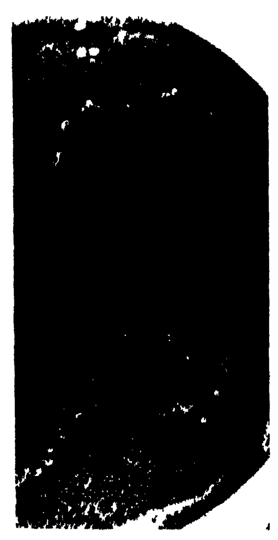


Abb. 3. Ausstrichplatte (Agar nach Emoto) am 7. Kulturtag bei 48° C. Zur Aussaat gelangte eine Öse der Kulturflüssigkeit der 2. Passage einer Anreicherungskultur in Emotoscher Lösung vom Versandschlamm Pi-Qua. Die weißen Wolken sind Ausscheidungen von elementarem Schwefel (Vers. R. 62 bdb). Leica-Nahaufnahme 1 : 3 bei seitlicher Beleuchtung; auf zwei Drittel verkleinert.

Thiobacterium Nr. 2.

Dieser Organismus ist morphologisch dem Th. Nr. 1 gleich. Unter denselben Bedingungen wie der vorhergehende kultiviert, scheidet er niemals Säure ab, so daß es nie zu Hofbildungen im Agar kommt. Es tritt immer „öliger" Schwefel auf (s. Abb. 3). Th. Nr. 2 kommt als Begleitorganismus von Th. Nr. 1 vor. Am stärksten vertreten ist er im Versandschlamm Pi-Qua. Im Kompressen-Schlammpulver fehlt er.

Die „Schwefeltröpfchen" sind bei dieser Thiobacterium-Art wie auch in den Häuten der Rohkulturen mesophiler Arten (Trautwein

niemals, wie es beschrieben wurde, aus amorphem, „oligem" Schwefel aufgebaut, sondern es sind vom Beginn ihrer Entstehung an, schon in der Größenordnung kleiner Bakteriensporen, Sphaerokristalle, deren radiartrichitischer Aufbau erst bei der „Auflösung" des Schwefels in den späten Phasen einer Passage verlorengeht. Auf weitere Einzelheiten soll später eingegangen werden.

Thiospirillum pistiense n. spec.

Vermehrung zu erzielen gelang vorläufig nur im CO_2-reichen und gleichzeitig O_2-armen Raum bei Temperaturen von 48° C in einer Mineralsalzlösung mit natürlichem Schwefelschlamm. Die bisher angewendeten Kulturbedingungen erlauben aber trotz mannigfacher Veränderungen noch nicht eine sichere Kultur und eine Trennung von den beiden vorher genannten Bakterien. Es konnte deshalb seine Verbreitung außerhalb des Thermalwasser-Abflusses noch nicht ermittelt werden. In Analogie zur Verbreitung der beiden vorher genannten kann mit seiner Anwesenheit im Schlamm gerechnet werden.

An vom Standort frisch geholten, dann anaerob bei 48° C bebrüteten Schlamm- und Wasserproben, in welchem er vorherrscht (s. Abb. 1) kommt es zur starken H_2S-Bildung. Es scheint nach den bisherigen Beobachtungen ein Organismus zu sein, welcher entweder aus dem Sulfat oder dem kristallisierten Schwefel Schwefelwasserstoff bildet.

Andere Organismen.

Die bisherigen Kulturversuche bei 48° C haben außer den genannten noch 2 andere Organismen erkennen lassen, von denen vor der Hand nur einer reingezüchtet werden konnte. Es ist dies ein Actinomyces, welcher thermophil oder wenigstens thermotolerant ist und auf Agar nach Emoto gutes Wachstum zeigt. Im Gegensatz zu den vorhergenannten vermag er auch Pepton als Nährstoffquelle auszunützen. Ihm scheinen die oben genannten Zellzustände anzugehören.

Außer den aufgezählten thermophilen, autotrophen Organismen ist in den Proben eine Anzahl mesophiler Bakterien in vegetativer Form nachweisbar, von denen verschiedene ebenfalls die Fähigkeit zum Thiosulfatabbau teils mit, teils ohne Schwefel-Abscheidung besitzen.

Die im Gange befindlichen Untersuchungen zielen auf eine weitere Klärung der Biocoenose und ihrer chemischen Leistungen ab.

Zusammenfassung.

Im sulfatischen Thermalwasser und im unter seinem Einfluß stehenden Schlamm von Pystian wurden thermophile, autotrophe Bakterien nachgewiesen, welche Schwefelverbindungen als Energiequelle ausnützen. Es konnten zwei, von den bekannten abweichende Thiobacterium-Arten und ein bisher unbekanntes Thiospirillum (Th. pistiense n. sp.) isoliert werden.

Literatur.

Ayyar, C. V. R., A sulfur oxydising organism from activated algue. (Journ. Indian Inst. Sc. Vol. 12. 1929.) — Baas-Becking, L. G. M., and Parks, G. L., Energy relations in the metabolism of autotrophic bacteria. (Physiol. Rev. Vol. 7. 1926.) — Bavendamm, W., Die farblosen und roten Schwefelbakterien. 1926 — Beijerinck, M. W., Über die Bakterien, welche sich im Dunkeln mit Kohlen-

säure als Kohlenstoffquelle ernähren können. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 11. 1904.) — Chorbuliez, E., et Herzenstein, A., Sur la présence probable d'un nouveau constituant soufré dans les eaux thermales de Pistany (Tschécoslovaquie). (Helv. Chimica Acta. T. 17. 1934 a;) Notes pour servir à l'analyse de quelques acides réducteurs du soufre. (Ibid. T. 17. 1934 b.) — Emoto, Y., Studien über die Physiologie der schwefeloxydierenden Bakterien. (Bot. Magazine, Tokyo. Bd. 47. 1933 a); Verbreitung der schwefeloxydierenden Bakterien in den Thermen Japans. (Ibid. Bd. 47. 1933 b); Die Mikroorganismen der Thermen. (Ibid. Bd. 47. 1933 c) (hier die gesamte Literaturübersicht). — Hynie, O., und Koutek, J., Geologie der wichtigsten Schlammarten Europas. Prag 1933. — Jensen, H. L., Vorkommen von Thiobacillus thiooxydans im dänischen Boden. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 72. 1927.) — Klein, G., und Limberger, A., Kreislauf des Schwefels im Boden. Ein Beitrag zur Biologie der Thiosulfatbakterien. (Biochem. Zeitschr. Bd. 143. 1923.) — Kořínek, J., s. Hynie. 1933. — Lipmann, J. G., and Waksman, S. A., Bacteria concerned in the oxydation of sulfur in the soil. Proc. 4th Internat. Soil. Sc. Conference. 1926. — Nathansohn, A., Über eine neue Gruppe von Schwefelbakterien und ihren Stoffwechsel. (Mitt. Zool. Station Neapel. Bd. 15. 1902.) — Stephenson, M., Bacterial Metabolism, London. 1930. — Trautwein, K., Beitrag zur Physiologie und Morphologie der Thionsäurebakterien (Omelianski). (Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 53. 1921.) — Uher, V., Bakteriologicky rozbor pišťánského bahna. (Bratisl. lékařské listy. Bd. 10. 1930.) — Vouk, V., Biologische Untersuchungen der Thermalwässer Kroatiens und Slavoniens. (Akad. Wiss. u. Künste der Südslawen, Zagreb. Bd. 8. 1919.) — Waksman, S. A., and Joffe, J. S., Microorganism concerned in the oxydation of the sulfur in the soil. II. Thiobacillus thiooxydans, a new sulfur-oxydising organism isolated from the soil. (Journ. Bact. Vol. 7. 1922) (hier die früheren Mitteilungen).

Nachdruck verboten.

The Urea-decomposing Microflora of Soils.

II. The Numbers and Types of the Organisms as shown by different Methods.

[From the Department of Bacteriology, College of Agriculture, Edinburgh.]

By **T. Gibson.**

The introduction by Beijerinck (2) of the principle of selective culture for the isolation of urea-decomposing bacteria from soils and other materials greatly facilitated the investigation of these organisms; and Beijerinck's methods, with minor modifications, have been adopted almost exclusively by later investigators. It appears, however, that these methods, while eminently suitable for the study of the more active urea-splitting bacteria in a soil, yield comparatively little information concerning the less active micro-organisms which may be responsible for the decomposition in the field. Several workers have employed the dilution method to estimate the numbers of ureaclastic bacteria in soils, but no attempt appears to have been made to utilise this technique as a means of securing cultures of those organisms which occur in the greatest numbers.

In this work the urea-decomposing microflora of soils was investigated, not only by employing Beijerinck's methods of enrichment, but also by other procedures yielding information which it is otherwise difficult to secure. The chief objects of the work were the identification and classification of organisms responsible for the decomposition and a study of conditions permitting of their growth. The influence of various factors on the

rapidity of the decomposition in soils has been described previously (Gibson 12); and the results secured in measuring the rate of decomposition in soils with widely different properties have also been published (13). These investigations raised a number of problems concerning the types of organisms which are concerned in the hydrolysis of urea. In particular, it was observed that urea may be rapidly ammonified in soils and peats which appear to be much too acid for the growth of active urea-decomposing bacteria (14, 16). The results of investigating the microflora of several soils are given in this paper, and an effort is made to correlate the findings with those of the previously-described decomposition tests.

The Results of Using Enrichment Cultures.

The use of enrichment cultures, prepared by inoculating urea-containing media with comparatively large amounts of soil, proved to be the only method of isolating the most active urea-decomposing bacteria in a sample. These organisms were found to occur in comparatively small numbers in all the soils examined, and the larger the inoculum the greater is the likelihood of securing their development. Lohnis (31) provides figures which show that the smaller the amount of soil introduced into a medium containing urea the slower and the more incomplete is the resulting ammonification. These results were confirmed in this work, and an investigation of the organisms isolated by different methods showed that the relationship between the intensity of decomposition and the amount of soil used as inoculum was mainly or entirely due to the scarcity of the most active bacteria and to the preponderance of the least active types. For most of the enrichment cultures used in this work 5 g of soil were added to 50 ml of medium, but in some cases double these amounts were employed. The media used were chiefly soil extract (12) and bouillon (1 per cent peptone + 1 per cent meat extract). Urea was added in the proportion of 5 per cent to soil extract and of 10 per cent to bouillon as it was found that these were the approximate concentrations required to suppress bacteria which do not decompose urea. Several other media were tested with one soil but as they did not appear to be selective for particular types of urea-decomposing organisms their use was abandoned. The majority of the cultures were prepared in Erlenmeyer flasks containing a comparatively shallow layer of medium. A few trials were made with tubes containing a deep layer of liquid, but the restriction of aeration appeared to have no selective effect. The most rapid decomposition was found to occur at about 37° C, but several of the organisms isolated from enrichment cultures incubated at 22° or at 30° were unable to grow at 37°.

From cultures inoculated with six different types of soil 44 organisms were isolated by plating on agar or gelatin containing 2 per cent urea. These organisms do not necessarily represent the types which predominated in each culture at the time of plating, for an effort was made to secure as many distinctive species of bacteria as possible, and colonies were sometimes selected on account of their structure or on account of the morphology of the organisms producing them. The majority of the pure cultures (38 strains) may be classified in the Pasteuri group (15) or in the series of variants of that group described in the preceding paper (16). Typical strains of B. Pasteuri which bring about a rapid decomposition of urea were obtained more frequently than the less active organisms of the group

(B. Loehnisii and B. Freudenreichii). Two acid soils did not yield cultures of B. Pasteuri, but the number of isolations was insufficient to determine whether the organism was entirely absent. Other urea-decomposing bacteria isolated from enrichment cultures are B. repens (1 strain), B. lentus (2 strains), B. fusiformis (2 strains) and B. carotarum (1 strain). These organisms decompose urea very feebly and their isolation is probably to be attributed to their ability to produce colonies which may be distinguished from those of the Pasteuri group rather than to their frequent occurrence in enrichment cultures.

The findings in this work are, in general, confirmatory of Beijerinck's (2) observations concerning the sequence in which different types of bacteria may be isolated from urea-containing media inoculated with soil. The results indicate, however, that the most actively ureaclastic strains of B. Pasteuri are among the first organisms to grow and, provided they occur in the inoculum, it is only their initial small numbers which makes their isolation difficult during the early phases in the development of a culture. The less active organisms may also persist to the extent of being able to produce colonies on the isolation plates up to the stage when the decomposition of urea has reached completion. The strain of B. repens and one of the strains of B. fusiformis were both isolated from completely ammonified cultures. A conclusion which may be drawn from this investigation is that enrichment cultures are necessary for the isolation of B. Pasteuri, but that the less active urea-splitting bacteria which tend to predominate during the early stages in the incubation of these cultures (the "Vorflora" of Beijerinck) may be investigated more effectively by means of the dilution method or by direct plating. The use of these procedures is described in the following sections of this paper.

The Results of Using Dilution Methods.

Dilution methods were employed with the object of providing information concerning the prevalence of urea-splitting bacteria in soils, and also for the purpose of isolating organisms which occur in large numbers but are readily overgrown in the usual enrichment cultures. The media used were 5 per cent urea soil extract and 10 per cent urea bouillon. These solutions were placed in tubes in which approximately 0.5 g of soil had been sterilised previously by steam under pressure, and the complete media were sterilised by intermittent steaming. Soils to be examined were passed through a 3 mm. sieve, dilutions were prepared in multiples of ten, and ten tubes of one or both of the media were inoculated from each of several dilutions. The tubes were placed in a 22° C incubator for four weeks, and all those in which the soil humus had not been dissolved by ammonia were sampled for titration. The most probable number of urea-decomposing bacteria in the soils was estimated by using the tables given by Halvorson and Ziegler (20).

Among the investigators who have employed the dilution method for urea-decomposing bacteria in soils, Rubentschik (38), Fehér (9, 10) and Duggeli (8) observed a seasonal variation in the numbers of the organisms. In this work an experiment was carried out with the purpose of investigating seasonal changes. A plot of garden soil, which received no treatment other than the destruction of weeds by surface hoeing, was sampled at approximately monthly intervals throughout a year. Each test

was made with two composite soil samples which were diluted separately and used for inoculating both the media. The results varied erratically from 28 000 to 2 700 000 per gram in the case of the 10 per cent urea bouillon and from 400 000 to 5 400 000 per gram in that of the soil extract medium, and the figures exhibited no tendency to rise or fall at particular seasons. On several occasions the results obtained from the two series of dilutions were markedly different. The method is obviously not accurate and it does not appear to be capable of demonstrating seasonal fluctuations. One source of error is probably a tendency of the organisms to remain dormant for considerable periods after being introduced into the media. It was observed that the longer tubes were incubated, up to seven weeks, the greater became the number which showed urea decomposition. Some indications were also obtained that different samples of media were not of equal value, and in view of previous observations (12) on the effect of temperature on these organisms, it is likely that the results may be influenced by comparatively slight changes in the temperature of incubation.

Tests were made with other plots of garden soil on which grasses, clover, potatoes and turnips were grown, but none of the crops produced a significant effect on the numbers of urea-decomposing bacteria in the soil.

In a previous paper (12) it was shown that in laboratory tests the reaction of a soil exerts a pronounced effect on the activity of its urea-decomposing microflora. A series of plots of soil, varying in reaction as a result of applying large quantities of calcium compounds to an originally strongly acid soil, were used in that work. It seemed likely that the results obtained were mainly attributable to the scarcity of ureaclastic bacteria in the acid soils, and in order to test this assumption 13 samples from the same series of plots were examined by the dilution method using 5 per cent urea soil extract. The reaction of the samples varied between pH 4.5 and pH 7.6. The results all fell within the limits of 210 000 and 2 400 000 per gram and they exhibited no relation to the reaction of the soils. This finding suggests that the increased activity, brought about by changing the reaction of a soil from the neighbourhood of pH 4.5 to the alkaline side of neutrality, cannot be attributed to an increase in the numbers of its urea-decomposing bacteria. The finding also shows that soils containing approximately the same number of the specific bacteria may exhibit marked differences in activity in solution and soil tests. If the numbers of urea-splitting bacteria bear little relation to their activity in the soil, it may be concluded that the practice of estimating their numbers as a means of characterising a soil from the biological point of view is valueless. The procedure does not appear to be based on any foundation of ascertained facts.

An investigation (13) of mountain and heath soils of exceptionally low agricultural value has shown them to be remarkably active in the decomposition of urea. The results obtained when four types of these soils (in each case 6 samples) were examined by the dilution method, using 5 per cent urea soil extract, are given in Table 1. The soils are all rich in organic matter. With the exception of the peats, they showed values for loss on ignition between 11 and 18 per cent of their oven-dry weights. On the basis of laboratory tests A and B can be described as active types. When urea is added to these soils the rate of decomposition is much more rapid than in any of the fertile cultivated soils which have been examined. Types C and D are inactive in solution tests but in soil tests the decomposition of urea is more

Table 1. Numbers of Urea-decomposing Bacteria in Mountain and Heath Soils.

Soil and herbage types	pH	Numbers per gram
A. Permanently waterlogged	5 0—6 3	10 000—350 000
B. Dry soils. Herbage mainly Festuca ovina and Ulex	4 8—5 2	110 000—920 000
C. Unfertile clay. Herbage mainly Nardus stricta	4 1—4 2	2 000—240 000
D Peats. Herbage mainly Calluna .	3 1—4 3	5 000—170 000

rapid than in the case of arable soils. The results secured by the dilution method again indicate that there is little or no relation between the urea-decomposing activity of a soil and its content of ureaclastic bacteria. It may be pointed out that the statements of Loew (30), that urea-splitting bacteria may be absent from various types of soil, have not been substantiated in this work. The soils which have been examined include the most acid peats, forest soils, and unfertile alkali soils, and the organisms were found in every sample.

The garden soil mentioned in a preceding paragraph was used in tests intended to show the proportion of urea-decomposing bacteria which occur in the form of spores under ordinary soil conditions. Each test was carried out by preparing dilutions in the usual way and also by heating a small quantity of the 1 : 100 dilution at 80° C for 15 minutes, the heated suspension being afterwards diluted to the necessary extent. The results obtained in each test from tubes inoculated with the unheated and pasteurised dilutions are given in Table 2. The figures, while somewhat erratic, indicate that a

Table 2. Proportion of Urea-decomposing Bacteria in Soil occurring as Spores.

Test	Medium	Most probable number per gram	
		Total	Surviving pasteurisation
1	Soil extract + 5 per cent urea	2 300 000	330 000
2	do.	400 000	290 000
3	do.	5 400 000	1 700 000
4	do.	2 800 000	1 700 000
5	Bouillon + 10 per cent urea	2 700 000	620 000
6	do.	1 500 000	660 000

considerable proportion of the organisms occur as spores. It is possible that the proportion of spores is greater than is indicated by these results. In pure culture many of the organisms produce spores or spore-like bodies with a low resistance to heat, and if they behave in a similar manner in soils a proportion of the spores would succumb to pasteurisation at 80° C. It is noteworthy that all the bacteria isolated in this work are spore formers or variants of such organisms.

Twenty-six urea-splitting organisms were isolated in pure culture from tubes inoculated with high dilutions of soils. The majority (21 strains) proved to be types of the Pasteuri group which bring about a slow decomposition of urea. Terminal-sporing bacilli which can be identified as B. Loehnisii were the most numerous. These experiments therefore indi-

cate that B. Loehnisii is the most prevalent urea-decomposing organism in soils. A typical B. Pasteurii was not obtained by this method of isolation. Some of the soils examined contain large numbers of Sarcina ureae, but this organism was never encountered when platings were made from tubes of liquid media inoculated with the highest dilutions which yielded a growth of ureaclastic bacteria. Other types which were isolated by a preliminary use of the dilution method are B. repens, B. lentus and a species of Monilia. The method is, however, unsuitable for cultivating urea-splitting fungi. The Monilia was observed to develop only once in tubes inoculated with high dilutions and on that occasion it was isolated in pure culture.

The Results of Using Direct Plating Methods.

Direct plating methods have proved to be valuable in studying organisms which do not grow readily in liquid media. For the isolation of pure cultures flasks containing 100 ml agar (2 per cent agar, 1 per cent peptone, 1 per cent meat extract, pH 7—7.5) are prepared, and immediately before use the medium is melted, 10 g crystalline urea are added, and after steaming for 10 minutes the agar is cooled and used for plating. Few organisms other than those which decompose urea are capable of growing on the medium. A 5 per cent urea agar is less inhibitive to urea decomposers but it is also less selective. The colonies of bacteria which rapidly produce ammonia from urea are usually surrounded by microscopic crystals in the agar, and an attempt was made to use these media for the counting of colonies on plates poured from soil dilutions. It was found, however, that the crystal formation and the selectivity of the media were not sufficiently definite for this purpose, and comparisons with the results of the dilution method showed that a proportion of urea-decomposing bacteria failed to develop on the plates. Pure cultures are isolated most readily by spreading a suspension of soil on the surface of the agar and incubating the plates at 22 or 30° C.

Direct plating appears to yield a greater variety of organisms than either of the other methods employed and, like the dilution method, it permits of the isolation of the most numerous urea-decomposing bacteria in a soil. For these reasons it was utilised to a greater extent than the other procedures, and 104 cultures were isolated by replating colonies which appeared on plates inoculated with soil. All the strains decompose urea slowly. This finding confirms the results obtained by utilising the dilution method. Both procedures show that the organisms, which on account of their large numbers might be expected to be those chiefly concerned with the decomposition of urea in soils, are not the active ureaclastic bacteria which predominate in the isolations made from enrichment cultures. In the soils examined, the organisms which produced the greatest number of colonies upon the plates were strains of the Pasteuri group together with closely-related bacilli. A typical B. Pasteuri was not encountered and B. Loehnisii was found more frequently than B. Freudenreichii. Direct plating was the only method by which cultures of Sarcina ureae were secured. In certain soils the numbers of this organism were about equal to those of the bacilli just mentioned. The plating method also appears to be the most suitable means of isolating B. lentus, B. repens and urea-splitting fungi, but in many soils these organisms are either absent or numerically unimportant and they do not develop on sparsely-seeded plates. One Ac-

tinomyces, one Mucor and eight strains of a Monilia species, all of which produce a slow action on urea, were isolated by this method. In view of Iwanoff's (24, 25) work, which showed that fungi may form urease only in media containing suitable non-nitrogenous substances, the organisms, and also other fungi isolated from soils, were tested for ureaclastic activity in urea bouillon containing glucose. The Actinomyces and the Monilia were indifferent to the carbohydrate but the Mucor failed to produce an appreciable decomposition except in media containing sugar.

Some of the acid soils referred to in the preceding section were examined by direct plating in an attempt to obtain an explanation of their surprisingly great activity in ammonifying urea. Most of these soils appear to be too acid to support the growth of urea-decomposing bacteria, and their content of such organisms was shown by the dilution method to be comparatively small. A considerable number of fungi have been observed to secrete urease by Miquel (36), Shibata (41), Hagem (19), Kappen (27), Kossowicz (28), Goris and Costy (17), Iwanoff (24, 25) and others, and a search was made for fungi or other aciduric organisms which hydrolyse urea but are incapable of proliferating easily in urea-containing liquid media. Dilutions of the soils were plated on 10 per cent urea agar, but the results were similar to those obtained when urea soil extract was inoculated with the dilutions. The numbers of ureaclastic bacteria were shown to be low, especially in the most acid samples, and the few fungi which appeared on the plates produced little growth. The addition of glucose to the medium was tried but no improvement in the development of fungi was observed. These results were interpreted as indicating that fungi were suppressed by the high concentrations of ammonia which is rapidly formed by bacterial colonies in the agar, and platings of the same soils were made with a more favourable medium in which bacterial growth is restrained. An agar with a pH of 6 containing mineral salts, 1 per cent glucose and 0.25 per cent urea was used. The urea was sterilised by filtration and added to the agar at 45° C. immediately before pouring the plates. Numerous fungi and a smaller number of yeasts and actinomycetes appeared on the plates. Thirty-eight cultures were purified and tested for their ability to decompose urea, but none of the organisms produced more than 0.4 mg of ammoniacal nitrogen per 1 ml in any of several urea-containing media in which they were cultivated. Nevertheless all the organisms were shown to contain some urease by the delicate test of adding the growths to a neutral urea solution containing phenol red and incubating the mixture, along with the necessary controls, at 45° C. These experiments indicate that fungi are unlikely to play an important part in decomposing urea even in the most acid soils. Further evidence confirming this conclusion was obtained by the Cholodny (5) microscopic technique. Slides were placed in soil contained in beakers, 1 per cent urea and sufficient water to bring the soil to its optimum moisture content were added, and at intervals during incubation at 22° C. the slides were withdrawn and examined. A rapid bacterial multiplication took place but the presence of urea retarded the growth of fungi and Actinomyces. Organisms of the two latter groups generally developed to a greater extent in the controls to which no urea was ed.

In view of these observations, and also of experiments described pre-

viously (12, 13), it appears to be certain that the great activity of the microflora of acid soils in decomposing urea is attributable to the presence of organic matter in an available form. When comparatively large quantities of urea are added to an acid soil, fungi and other inactive organisms may start the decomposition. The experiments of Briouxs (4) and several subsequent workers have demonstrated that soils become more alkaline during the decomposition, and once the process is initiated it is likely to result in localised portions of soil becoming suitable in reaction for the growth of an originally small number of active urea-decomposing bacteria. The existence of the latter in an unfavourable environment may be accounted for by the finding that they are entirely spore-forming types.

Comparison of the Results with those of previous Investigations.

In this discussion reference will be made only to those organisms which have been found to occur in soils. The work described in this and also in a previous (13) paper indicates that if urea-splitting organisms should be introduced into soils from other sources they would be greatly outnumbered by the indigenous bacteria, and further, that the organisms which play the major part in the decomposition are those which belong to the normal soil microflora. Of the various materials which may be applied to soils, farmyard manure would be expected to contain the largest inoculum of urea-hydrolysing bacteria. These studies have shown, however, that frequent and heavy applications of dung can have little if any influence on the numbers and types of ureaclastic organisms in a soil.

In considering the results described here along with those obtained by Beijerinck (2), Lohnis (33), Sohngen (42) and Rubentschik (39), it is apparent that the urea-splitting bacteria most frequently isolated from soils by means of enrichment cultures are organisms closely related to B. Pasteuri. It has now been shown by this investigation that the less active organisms of the Pasteuri group (B. Loehnisii and B. Freudenreichii) may be regarded as being generally the most numerous ureaclastic bacteria in soils.

There is little agreement among different investigators concerning the occurrence in soils of organisms which may be distinguished definitely from bacilli of the Pasteuri group. This position is probably to be explained by variations in methods, by differences in the soils used, and by the comparative rarity of certain organisms. The recently-described spore formers B. lentus and B. repens, which occur numerously in certain soils, were probably isolated in this investigation mainly as a result of utilising new methods. The decomposition of urea by B. fusiformis and B. carotarum does not appear to have been observed by previous workers. These organisms occur in much smaller numbers than other ureaclastic bacteria in the single type of soil in which they were found, and their isolation here is probably to be looked upon as a chance result. Other species of aerobic spore-forming bacilli which are capable of growing easily upon ordinary media were not obtained from any of the soils examined. The isolation of urea-splitting strains of B. mycoides and B. megatherium by Düggeli (7), of B. pumilus by Bierema (3), and of an unidentified bacillus (culture 10 B) by Greaves (18) should therefore be regarded as results which depend upon special methods or do not apply to soils generally.

Sarcina ureae was shown by this work to be numerically one of the chief organisms in certain soils. Other sarcinae were not detected. Some of the common sarcinae found in the air are capable of hydrolysing urea but if these organisms are derived from soils it is likely that they occur there only in small numbers. Micrococci of various types, which differ in colour and in their action on gelatin and milk, are frequently observed to bring about an ammoniacal decomposition in urine, and they have been isolated from soils by Warington (46), Miquel (35), Beijerinck (2), Düggeli (7), Rubentschik (38, 39) and Hucker (22). Micrococci were not encountered, however, in this investigation, and it seems likely that their importance in the decomposition of urea in soils is negligible. A similar conclusion is suggested by Beijerinck's (2) experiments.

No representatives of the Coli-Aerogenes or Proteus groups were observed in this work. Kalantarian (26) and also Düggeli (7) record the isolation of B. vulgare and of coliform organisms, and Löhnis (33) and Kalantarian obtained cultures of a B. vulgare var. Zopfii. Löhnis (34) considered that Beijerinck's (2) Urobac. miquelii and Söhngen's (42) Urobac. Jakschii belong to the Proteus group, but neither of these species has been described in detail. It might be expected that ureaclastic strains of the Proteus and Coli groups would have been observed more frequently if they are widely distributed in soils.

Previously-undescribed fluorescent organisms which, on account of their physiology and their spore-forming ability, are probably variant types of the Pasteuri group were isolated here, but none of the typical members of the Fluorescens group were found in the soils examined. Urea-decomposing strains of B. fluorescens and B. putidum have been isolated from soils previously by Heraeus (21), Warington (46), Liebert (29) and Kalantarian (26). When the methods used by these workers and also by Schellmann (40) are considered, it seems likely that enrichment cultures in urine or other simple media may be necessary for the successful demonstration of ureaclastic fluorescent bacteria in soils. Other urea-splitting soil organisms which were not observed in this investigation are the Mycobacteria studied by Söhngen (43) and Vierling (45), and the organisms resembling Corynebacteria (B. Kirchneri and B. erythrogenes) isolated by Löhnis (32, 33) and Söhngen (42). The ureaclastic activity of these bacteria appears to be of a low order, and it is doubtful if their isolation can be accomplished easily by methods in which tolerance of urea or of ammonia is the principle of selective culture. Christensen's (6) Urobac. Beijerinckii, a non-sporing motile rod which produces a yellow growth, was not encountered in this work. It was claimed that this organism is capable of growing in media containing no organic compound other than urea, but the evidence presented by Christensen cannot be regarded as an adequate proof of his conclusion.

Since Tissier and Martelly's (44) work on meat, obligate anaerobes have been accounted (37, 48) among the urea-decomposing microorganisms of soils. A few attempts were made in this work to isolate these bacilli from anaerobic enrichment cultures but none were successful. Tests of ability to hydrolyse urea were also made with pure cultures of B. Welchii, B. saccharobutyricus, B. tertius, B. sporogenes,

B. tetanomorphus and B. tetani, but in every case the results were negative. Ishikawa (23) also failed to bring about the decomposition with three species of anaerobes. It appears that the rapid ammonification of urea in soils maintained under anaerobic conditions (12, 13) can be attributed to strains of the Pasteuri group (11, 14) or other facultative anaerobes and, possibly under certain circumstances, to the action of urease produced previously by organisms growing in the presence of oxygen.

There are a few records (1, 2, 47) of urea decomposition by Actinomyces, but in the experiments described here only one organism of that genus was isolated which satisfies the test used for the recognition of ureaclastic bacteria. A considerable proportion of the fungi which have been observed to decompose urea (p. 420) are probably types which occur in soils. The evidence adduced in this work indicates, however, that few fungi can be regarded as urea-decomposing organisms in the sense in which that term has been used in bacteriology. It seems probable that actinomycetes and fungi are too sensitive to the action of ammonium carbonate to exhibit urease activity comparable with that of many bacteria.

Summary.

The dilution method, as used for estimating the numbers of urea-decomposing bacteria in soils, gives erratic results and was found to be incapable of demonstrating a seasonal variation. An examination of soils of different character by the dilution method showed that the content of ureaclastic bacteria bears no relation to the rate at which urea is decomposed in the soil. In strongly acid soils, in which the organisms are comparatively scarce, a rapid decomposition of urea appears to be attributable to a high content of available organic matter. The more active bacteria may be incapable of multiplying in acid soils in the absence of urea, and their ability to form spores probably accounts for their occurrence. In the soils examined, the majority of ureaclastic bacteria produce a slow action on urea while the most active organisms occur in small numbers. Direct plating is a suitable method of investigating the most numerous organisms (B. Loehnisii, B. Freudenreichii, B. lentus, B. repens, and Sa. ureae), but enrichment cultures inoculated with comparatively large quantities of soil are necessary for the isolation of the most active type (B. Pasteuri). Fungi and actinomycetes are unable to produce a rapid breakdown of urea. The results of this work are compared with those of previous investigations.

Literature.

1. Adachi, M., and Imamura, T., Journ. Soc. Trop. Agric. Taiwan. Vol. 5. 1933. p. 121—130; Abstr. in Biol. Abstr. Vol. 8. 1934. Entry 16055. — 2. Beijerinck, M. W., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 7. 1901. S. 33—61. — 3. Bierema, S., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 672—726. — 4. Brioux, C., Compt. rend. Acad. Sci. T. 179. 1924. p. 915—917. — 5. Cholodny, N., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 620—652. — 6. Christensen, H. R., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 27. 1910. S. 336—362. — 7. Düggeli, M., Naturw. Wochenschr. Bd. 14. 1915. S. 305—315; Abstr. in Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 47. 1917. S. 641—642. — 8. Düggeli, M., Schweizer. Ztschr. f. Forstwesen. Jahrg. 81. 1930. S. 357—365; Abstr. in Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 138. — 9. Fehér, D., Biochem. Ztschr. Bd. 206. 1929. S. 416—435. — 10. Fehér, D., Arch. f. Mikrobiol. Bd. 1. 1930. S. 464—492; Abstr. in Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 84. 1931. S. 138. — 11. Geilinger, H., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 47. 1917. S. 245—301. — 12. Gibson, T., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 81. 1930. S. 45—60.

— 13. Gibson, T., Journ. Agric. Sci. Vol. 20. 1930. p. 549—558. — 14. Gibson, T., Journ. Bact. Vol. 28. 1934. p. 295—311, 313—322. — 15. Gibson, T., Journ. Bact. Vol. 29. 1935. p. 491—502. — 16. Gibson, T., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II, Bd. 92. 1935. S. 364—380. — 17. Goris, A., et Costy, P., Compt. rend. Acad. Sci. T. 175. 1922. p. 539—541. — 18. Greaves, J. D., Soil Sci. Vol. 28. 1929. p. 344. — 19. Hagem, O., Videnskabs Selskab. Skrifte. I. Mathm.-naturw. Klasse. 1910. Nr. 4; Abstr. in Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 29. 1911. S. 209—213. — 20. Halvorson, H. O., and Ziegler, N. R., Journ. Bact. Vol. 25. 1933. p. 101—121. — 21. Heraeus, W., Ztschr. f. Hyg. Bd. 1. 1886. S. 193—242. — 22. Hucker, G. J., New York State Agric. Exp. Sta. Techn. Bull. No. 135. 1928. — 23. Ishikawa, M., Journ. Infect. Dis. Vol. 43. 1928. p. 67—80.— 24. Iwanoff, N. N., Biochem. Ztschr. Bd. 157. 1925. S. 229—242. — 25. Iwanoff, N. N., Hoppe-Seylers Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 170. 1927. S. 274—288. — 26. Kalantarian, P., Diss. phil. Leipzig 1911. — 27. Kappen, H., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 26. 1910. S. 633—643. — 28. Kossowicz, A., Ztschr. f. Gärungsphysiol. Bd. 1. 1912. S. 60—62. — 29. Liebert, F., Afdeel. Akad. Amsterdam. Bd. 17. 1909. S. 990—1001. — 30. Loew, O., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 70. 1927. S. 39—41. — 31. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 12. 1904. S. 448—463. — 32. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 14. 1905. S. 87—101, 389—400. — 33. Löhnis, F., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 14. 1905. S. 714—723. — 34. Löhnis, F., Handb. landw. Bakteriologie. Berlin 1910. — 35. Miquel, P., Annales de Micrographie. Vol. 5. 1893. p. 161—182, 209—234. — 36. Miquel, P., In Lafars Handb. techn. Mykologie. Bd. 3. 1904. S. 71—83. — 37. Orla-Jensen, S., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 22. 1909. S. 305—346. — 38. Rubentschik, L., Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskr. Bd. 106. 1926. S. 265—274. — 39. Rubentschik, L., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 66. 1926. S. 161—180. — 40. Schellmann, W., Diss. phil. Göttingen 1902. — 41. Shibata K., Beitr. z. chem. Physiol. u. Path. Bd. 5. 1904. S. 384—394. — 42. Söhngen N. L., Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 23. 1909. S. 91—98. — 43. Söhngen, N. L. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 37. 1913. S. 595—609. — 44. Tissier, H., et Martelly, Ann. Inst. Pasteur. T. 16. 1902. p. 865—903. — 45. Vierling, K. Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 52. 1921. S. 193—214. — 46. Warington, R. Journ. Chem. Soc. Vol. 53. 1888. p. 732—734. — 47. Waksman, S. A., Soil Sci Vol. 8. 1919. p. 71—215. — 48. Waksman, S. A., Principles of Soil Microbiol. Ed. 2. London 1931.

Nachdruck verboten.

Zur Frage der Wirkung der Mikroben auf Fette.

Von **L. M. Horowitz-Wlassowa** und **M. J. Livschitz.**

Mit 1 Abbildung im Text.

Die Frage der Umwandlungen der Fette und Öle unter der Wirkung der Mikroben, deren große theoretische und praktische Bedeutung auf der Hand liegt, bedarf noch mancher Erörterungen; spärliche Angaben, die in der Literatur darüber vorliegen, ermöglichen bis jetzt keineswegs die Darlegung dieses Kapitels der Mikrobiologie mit der erforderlichen Klarheit und Vollkommenheit, die z. B. der Lehre über die proteolytische Wirkung der Mikroben oder über Gärungen eigen sind. Die Klärung ist zweifelsohne mit Schwierigkeiten verbunden, die bei dergleichen Untersuchungen in Betracht kommen und schon zahlreiche irrtümliche und sich widersprechende Schlüsse verursacht haben: erstens wurden die meisten Untersuchungen nicht mit reinen Fetten, sondern mit fettreichen Nährstoffen, wie Butter, Margarine usw. ausgeführt, so daß die Resultate der Analysen sich nicht nur auf Umwandlungen der Fette, sondern auch der Proteine und der Kohlenhydrate beziehen und darum schwer zu deuten sind; zweitens sind die Fette

gegenüber äußeren Einflüssen, die bei den Versuchen nicht genügend ausgeschaltet wurden, höchst empfindlich; schließlich sind derartige Untersuchungen ziemlich schwierig und zeitraubend, da wir bis jetzt nicht über einfache, leicht sichtbare Kriterien der Wirkung der Mikroben auf Fette verfügen, wie es für die proteolytische Wirkung oder die Labtätigkeit der Fall ist.

Da wir auch keine reinen Triglyzeride zur Verfügung hatten, mußten wir die Hauptversuchsserie mit natürlichen Ölen, namentlich mit dem Soyaöl anstellen, welches wir in großen Mengen erhalten konnten und welches wegen des hohen Gehaltes an ungesättigten Fettsäuren leicht verdirbt. Alle Versuche dieser Serie wurden mit einer und derselben Menge angestellt, die während dieses Zeitraums in verschlossenen Gefäßen, ohne Zufuhr von Luft im Dunkeln aufbewahrt wurde und niemals Aldehydreaktionen aufwies.

Am Ende des Versuches wurde jede Versuchsprobe auf Sterilität (oder Reinheit der Kultur) geprüft und nach dem folgenden Schema untersucht: 1. Geschmack, 2. Farbe, 3. Geruch, 4. refraktometrischer Index, 5. Oxysäuren, 6. Peroxyde, 7. Säurezahl, 8. freies Glyzerin, 9. Reaktion von Schiff, 10. Reaktion von Kreis, 11. Reaktion mit dem ammoniakalischen Silber, 12. die Jodzahl, 13. freier und locker gebundener Sauerstoff, 14. Verseifungszahl. In einzelnen Fällen wurde auch die Kaprylzahl und die Oxydierbarkeit des Destillats nach Issoglio (1) bestimmt. Da alle diese Methoden in den betreffenden Handbüchern und Leitfäden angegeben sind, glauben wir auf deren Beschreibung verzichten zu können; es sollen hier nur diejenigen erwähnt werden, die wir selbst zum erstenmal erprobten — namentlich die „Pyrogallolprobe" und die „biologische Probe" zum Nachweis des „labilen Sauerstoffes". Es gibt bekanntlich zahlreiche Proben, die diesem Zweck dienen, wie die Reaktionen von Schönbein, Ditz, Ventilesco und Popesco, von Davies, Nauroy usw. Da aber einige darunter Reagentien erfordern, die häufig unzugänglich sind, andere nicht beweiskräftig genug sind, haben wir einige neue Methoden angewandt.

Die „Pyrogallolprobe" wird in folgender Weise ausgeführt: in ein kleines Röhrchen werden zuerst 0,5 g Pyrogallol, dann 4 ccm des zu prüfenden Öles und schließlich 2 ccm 20proz. NaOH-Lösung eingeführt; dann wird das Röhrchen gut verschlossen, so daß der Kork die Flüssigkeit berührt und der Inhalt durch mehrfaches Umschütteln gut gemischt (es empfiehlt sich, ein winziges Luftbläschen im Röhrchen unter dem Kork zu lassen, welches ein besseres Umschütteln ermöglicht, ohne das Resultat ungünstig zu beeinflussen). Werden die erwähnten Vorsichtsmaßregeln genau innegehalten, um den Luftzutritt nach der Bildung der alkalischen Pyrogallollösung zu verhindern, so bleibt das Gemisch mit frischem Öl stundenlang farblos oder schwach bräunlich, während das Gemisch mit oxydiertem Öl sofort eine schwarze Farbe annimmt.

Ebenso demonstrativ ist die „biologische Probe", die folgenderweise angestellt wird: Die Reinkultur einer aerophilen, in die Subtilis-Gruppe gehörenden Bakterienart, wie B. implexus z. B., wird auf schrägem Agar in 2 Röhrchen geimpft, dann wird in ein Röhrchen frisches, ins zweite oxydiertes Öl eingeführt. Im ersteren Röhrchen bleibt das Wachstum unter der Ölschicht aus, im zweiten dagegen wächst der B. implexus um so besser, je mehr locker gebundenen Sauerstoffes das Öl enthält.

Was nun die Methodik der quantitativen Bestimmungen anbetrifft, so sei hier folgendes erwähnt. Oxysäuren wurden nach Fahrion (2) bestimmt, dessen Methode bekanntlich auf der Unlöslichkeit der Oxysäuren in Petroläther beruht, Peroxyde — nach Tafel und Revis (3) — (Freimachen des Jodes der Jodide durch die Peroxyde unter Anwendung der üblichen Jodometrie), der Säuregehalt wurde „als Säurezahl" ausgedrückt, d. h. in Milligramm KOH, die für die Neutralisation von 1 g Öl erforderlich sind. Für den Nachweis des freigemachten Glyzerins haben wir die Reaktion von Denigès mit Salizylsäure benutzt, für quantitative Bestimmungen haben

wir, dem Rate von Prof. Aschmarin folgend, die Boratmethode angewendet (die umgekehrte Anstellung der Methode von Sorensen, die fur die quantitative Bestimmung der Borsaure vorgeschlagen worden ist). Die Jodzahl wurde nach Hubl bestimmt, die Kaprylzahl nach Großfeld (4). Soviel uber die Methodik.

A priori kann die Wirkung der Mikroben auf Fette eine zweifache sein: 1. eine lipolytische und 2. eine oxydative. Die lipolytische Tätigkeit der Mikroben wurde schon von manchen Autoren beschrieben — Müller (5), Gottstein (6), Krüger (7), v. Sommaruga (8), Schmidt (9), Rubner (10), Schreiber (11), Reinmann (12), Jensen (13), Laxa (14), Gerard (15), Camus (16), Biffen (17), Spieckermann und Bremer (18), Tissier und Martelly (19), Carrière (20), Ejkman (21), Achalme (22), Rogers (23), Rahn (24), Haag (25), Huss (26), Horowitz-Wlassowa und Livschitz (27, 28), Sseliber (29), Plotkina (30), Netschaïewa (31) u. a. Doch sind die häufig benutzten Methoden des Nachweises der lipolytischen Wirkung, wie die Steigerung des Säuregehalts und das Freimachen des Glyzerins nicht immer zuverlässig: einerseits können die in unseren üblichen Nährmedien gebildeten Säuren verseift werden, anderseits wird das freigemachte Glyzerin rasch von Mikroben verbraucht — demgemäß kann das Ausbleiben beider Merkmale keineswegs die Lipolyse ausschließen. Außerdem kann der Säuregrad, auch ohne die Lipolyse, infolge der Oxydation der hochmolekularen Säuren steigen (die Neutralisationskoeffizienten niedrigmolekularer Säuren, wie der Essig- und Ameisensäure betragen tatsächlich 934,52 und 1219,3, während derselbe Wert für die Oleïnsäure 198,15 ist). Was nun die oxydative Wirkung der Mikroben auf Fette anbetrifft, so sind entsprechende Angaben in der Literatur sehr spärlich; so konnten wir nur die Angabe von Herzog und Meier (32) finden, daß Penicillium verschiedene Oxysäuren, wie die Milch-, Trauben- und Äpfelsäure zu oxydieren vermag; diese Autoren konnten sogar die Oxydase im mittels Azeton und Methylalkohol getöteten Myzel des Pilzes nachweisen. Außer den chemischen Kriterien wurde auch eine Anzahl von bakteriologischen Verfahren angegeben, die die lipolytische Wirkung aufweisen sollen: es seien hier die Methoden von Ejkman, Söhngen, Carnot und Mauban und auch Löhnis erwähnt. Nach Ejkman soll die weißliche Färbung der Fettschicht unter der mit der betreffenden Art beimpften Agarschicht als der Beweis der stattgefundenen Lipolyse betrachtet werden. Achalme aber weist mit Recht darauf hin, daß die Diffusion des gebildeten Ammoniaks dieselbe Folge hat. Es soll auch nicht außer acht gelassen werden, daß diese Methodik, bei den Fetten die beim Kontakt mit dem verflüssigten, also heißen Agar selbst flüssig werden, kaum anwendbar ist. Dasselbe gilt für das Verfahren von Söhngen, der die weißliche Färbung nicht auf der Platte, sondern im Röhrchen beobachtet. Der Zusatz gesättigter $CuSO_4$-Lösung zu den Fettagarkulturen nach Carnot und Mauban ergibt nach unseren Beobachtungen kein deutliches Bild. Verschiedene Autoren empfehlen zum Nachweis der lipolytischen Wirkung auch den Milchagar, der auf zweierlei Weise hergestellt werden kann: durch Vermischung des üblichen Fleischpeptonagars mit der Milch oder durch Zusatz von 10% Milch zur Agarlösung nach Löhnis; die Bildung einer klaren Zone auf undurchsichtigem, weißen Nährmedium um die Kolonien der zu prüfenden Art herum soll die lipolytische Wirkung dieser Art beweisen. Die Autoren sind sich aber über die Deutung dieser Erscheinung nicht einig, so schreiben z. B. Le Blaye und Guggenheim die Bildung der durchsichtigen

Zone der Bildung kleiner Mengen von Säuren zu; beim Entstehen großer Säuremengen soll dagegen nicht die Klärung, sondern die weißliche Trübung zur Beobachtung kommen. Wir haben diese Angaben nachgeprüft und haben die Überzeugung gewonnen, daß für obige Erscheinungen solche Säuremengen erforderlich sind, die in Kulturen niemals in Betracht kommen. So bewirkt z. B. die 1—2proz. Lösung von Weinsäure unter diesen Verhältnissen keine sichtbaren Änderungen; die 5proz. Lösung ruft die Bildung der klaren Zone hervor; die 10proz. Lösung bewirkt eine vorübergehende Trübung, die rasch wieder verschwindet; bei 20% schließlich wird der Milchagar stark getrübt und zuweilen bildet sich umher der getrübten Zone ein klarer Ring. Dasselbe gilt auch für die Milchsäure, die aber eine schwächere Wirkung im Vergleich zur Weinsäure ausübt. Die Beteiligung der Säuren muß also bei der Bewertung der Klärung des Milchagars ausgeschaltet werden, da selbst energische Milchsäurewecker, wie B. bulgaricus, B. Orenburgii u. a. nicht über 3,5% Milchsäure bilden. Anderseits wird der Milchagar auch von Arten geklärt, die keine Säurebildner sind und sogar Alkali bilden, wie B. pyozyaneus, B. fluorescens liquefaciens, die Mesentericus-Gruppe u. a. Es besteht ferner kein Parallelismus unter dem klärenden Effekt und der peptonisierenden Wirkung der Arten, so daß es unmöglich ist, ihn nur auf die Lösung des Kaseins z. B. zurückzuführen — so bleibt die Klärung der Milchagarkulturen des B. proteus vulgaris aus. Wir sind darum der Meinung, daß diese Erscheinung sich hauptsächlich auf die Spaltung des Milchfettes und die Bildung löslicher Seifen bezieht, wenn auch die peptolytische Wirkung dabei eine gewisse Rolle spielt. Es soll hier auch das Verfahren von Russi erwähnt werden: Verwendung von Fettagar, der durch kräftiges Schütteln eines Öls, wie z. B. Soyaöl, mit verflüssigtem Fleischpeptonagar hergestellt wird; lipolytische Mikroben bilden auf diesem Nährsubstrat klare Zonen, wie wir es bestätigen konnten. Auf Grund unserer eigenen Untersuchungen glauben wir berechtigt zu sein, noch 2 Proben — namentlich die „Kaliprobe“ und die „Nilblauprobe“ vorzuschlagen.

Die erstere Probe beruht auf der allbekannten Tatsache, daß freie Fettsäuren viel leichter und rascher verseift werden können, als neutrale Fette — bekanntlich wird der Säuregrad der Fette durch Austitrieren mit der schwachen Alkalilösung bei Zimmertemperatur bestimmt, die Verseifungszahl dagegen durch 15 Minuten langes Erwärmen des Fettes mit der starken Alkalilösung. Es lag der Gedanke nahe, daß der undurchsichtige Soyaölagar, im Falle der vorgeschrittenen Lipolyse beim Kontakt mit der starken KOH-Lösung sofort durchsichtig werden würde (infolge der Bildung leicht löslicher Ka-Seifen). Direkte Versuche zeigten aber, daß ein Tropfen der 15proz.

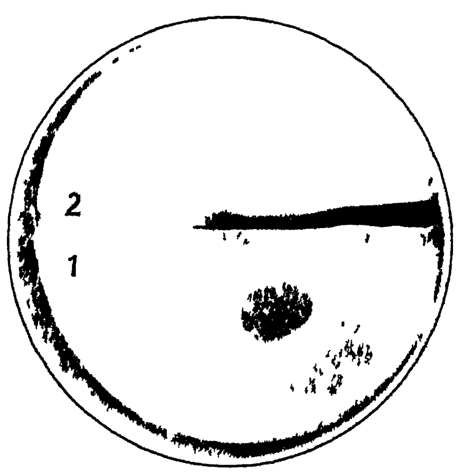


Abb. 1. Kaliprobe auf festem, synthetischen Nährboden (siehe im Text) mit emulgierten Fettsäuren. 1. Oleïnsäure — Klärung des Nährbodens. 2. Oxystearinsäure — weißlicher opaker Flecken.

KOH-Lösung bei der Diffusion in den Soyaölagar keine Klärung des Nährsubstrats hervorruft; wird dagegen das Soyaöl bei der Herstellung des Agars mit Oleïnsäure vermischt, so kommt an der Stelle, wo die KOH-Lösung zugesetzt wurde, ein klarer Flecken zur Beobachtung — der Nährboden wird um so durchsichtiger unter der Wirkung der KOH-Lösung, je höher sein Gehalt an Oleïnsäure ist (Abb. 1).

Diese Probe wurde an 44 Arten geprüft: 14 asporogene Stäbchenarten, 7 Vertreter der Subtilis-Gruppe, 2 Milchsäurewecker, namentlich B. Leishmanni und Lactobacillus sporogenes n. sp., 8 Kokkenarten, 8 Hefen, 5 Schimmelpilzen. Die geprüften Arten wurden auf den mineralischen festen Nährboden (0,1% K_2HPO_4, 0.1% KNO_3, 0.1% $MgSO_4$. 0,1% $CaCl_2$. 0,01% NaCl) mit emulgiertem Soyaöl gebracht. Es erwies sich, daß nur 18 Arten von diesen 44 auf diesem Nährboden ein ziemlich gutes Wachstum ergaben, namentlich alle Schimmelpilzarten und die Mehrzahl der asporogenen Stäbchen; was die Hefen anbetrifft, so erwies sich dieses Nährsubstrat nur für 3 (Saccharomyces anomalus, Sacch. ellipsoideus, Sacch. oxycocci) als günstig genug. Es soll hier bemerkt werden, daß bei Verwendung des üblichen Fleischpeptonagars mit emulgiertem Soyaöl an Stelle unseres synthetischen Nährbodens irgendwelche Wirkung ausblieb, wenn die Arten sich auch auf dem synthetischen Nährboden, in dem das Öl die einzige Kohlenstoffquelle war, nicht entwickelten. Bei der Prüfung der 18 Arten, die sich gut darauf vermehrten, wurde außer der Kaliprobe noch eine Anzahl von Reaktionen durchgeprüft, namentlich 1. die Nilblauprobe, 2. die Aussaaten auf Milchagar, 3. auf Endoagar mit Soyaol an Stelle der Laktose, 4. auf Endoagar mit Glyzerin an Stelle der Laktose, 5. Probe von Ejkman, 6. Probe von Söhngen, 7. die Säurezahl der Fettphase der Kultur im flüssigen mineralischen Nährboden mit emulgiertem Soyaöl, 8. die Säurezahl der Wasserphase, 9. Nachweis der Peroxyde, 10. Nachweis der Aldehyde und zuweilen deren quantitative Bestimmung nach Lea.

Die Steigerung des Säuregehalts in der Fettphase, die wir als das Grundkriterium der stattgefundenen Lipolyse angesehen haben, erlaubt diese 18 Arten in 2 Hauptgruppen zu verteilen: 1. Arten, die freie Säuren auf Kosten des Öls bilden, 2. Arten, die keine Säurebildung in diesen Verhältnissen aufweisen. Zur ersteren Kategorie gehören B. pyozyaneus, B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosus, B. viscosus sacchari, B. cloacae, B. butyri II und Schimmelpilze, wie Sterigmatocystis nigra, Citromyces Pfefferianus, Mucor racemosus, im minderen Grade B. galleriae (Art, die Prof. Sseliber uns mit dem B. butyri I und II in liebenswürdiger Weise übergeben hatte). Für alle diese Arten erwiesen sich die Proben von Ejkman und Söhngen, ebenso die Nilblauprobe und die Probe auf dem Milchagar als positiv. Unsere Kaliprobe ergab mit den 8 tägigen Kulturen des B. pyozyaneus, B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosus, B. viscosus sacchari ein gut ausgeprägtes positives Resultat, für den B. cloacae und den B. butyri II dagegen fiel die Probe negativ aus. Es folgt daraus, daß der positive Ausfall der Kaliprobe für die starke lipolytische Wirkung spricht (die Säurezahl der Fettphase beträgt in diesen Fällen ca. 25 mg); für schwächere Lipolytiker dagegen scheint die Probe nicht empfindlich genug zu sein.

Es sei hier auf eine Erscheinung hingewiesen, die ein besonderes Interesse beansprucht. 2 Kulturen, namentlich B. *viscosus sacchari* und B. *cloacae* riefen zuweilen die Bildung weißlicher opaker Flecken auf unserem Nährboden hervor, die später verschwanden. So konnten wir in zahlreichen Versuchen mit dem B. *viscosus sacchari* konstatieren, daß die 5 tägige Kultur bei der Kaliprobe die Weißfärbung, die 8 tägige dagegen die Bildung der klaren durchsichtigen Zone aufwies.

Um die sich dabei abspielenden Vorgänge zu erörtern, haben wir eine Reihe von Agarplatten mit dem Öl und mit verschiedenen Fettsäuren hergestellt: mit der Palmitin-, Kapryl-, Kapron-, Eruk- und Oxystearinsäure (die letztere hatten wir selbst mittels Oxydation der Oleïnsäure mit $KMnO_4$ hergestellt). Die Versuche ergaben folgende Resultate: die Platten mit der Palmitin-, Kapryl- und Kapronsäure (die lösliche Kaliseifen bilden) ergaben bei der Kaliprobe die Bildung wasserklarer Flecken auf der opaken Oberfläche, die Platten mit der Eruca- und Oxystearinsäure dagegen die Bildung weißlicher opaker Flecken, die nicht von den oben für den B. *viscosus sacchari* und den B. *cloacae* beschriebenen zu unterscheiden waren. Wir meinen deswegen, daß es sich in beiden Fällen um die Bildung der Oxysäuren handelt, die unlösliche Ka-Seifen ergeben; die Kaliprobe ermöglicht also nicht nur den Nachweis der lipolytischen, sondern auch der oxydativen Wirkung; zu dieser letzteren Frage kehren wir später zurück.

Es soll hier bemerkt werden, daß für Schimmelpilze die Kaliprobe wegen ihres filzartigen Wachstums wenig geeignet ist, da die Änderungen des Nährbodens schwierig zu beobachten sind. Die Arten, die keine Steigerung des Säuregehalts in der Fettphase aufwiesen, ergaben mit der Kaliprobe bestimmt negative Resultate. — Die zweite, von uns empfohlene Probe, die Nilblauprobe, beruht auf der Eigenschaft dieser Farbe, Neutralfette rot, freie Fettsäuren dagegen blau zu färben. Wird ein Tropfen dieser Lösung auf unsere mit den betreffenden Arten beimpften Ölagarplatten geträufelt, so nimmt er beim Vorhandensein der lipolytischen Wirkung den blauen Farbton an; für 34 nicht lipolytische Arten fiel die Nilblauprobe negativ aus. — Außer der lipolytischen Wirkung ließen sich in unseren Kulturen Änderungen beobachten, die auf Oxydationsvorgänge zurückgeführt werden müssen. In dieser Hinsicht beansprucht ein besonderes Interesse der B. *viscosus sacchari*, dessen Kulturen im flüssigen mineralischen Nährboden mit Soyaöl die Bildung von Peroxyden, Aldehyden und wasserlöslichen Säuren aufweisen; das freigemachte Glyzerin wird dabei unter Bildung von Säuren, Aldehyden und Gasen rasch vergärt — es ist damit gesagt, daß diese Bakterienart ein höchst seltenes Beispiel der vereinigten lipolytischen und fettoxydierenden Wirkung vorstellt. B. *cloacae* verhält sich gegen Fette in ähnlicher Weise, aber seine Leistungsfähigkeit ist viel schwächer; er ergibt ein rotes Wachstum auf dem Endoagar mit dem Glyzerin an Stelle der Laktose und scheint ungesättigte Fettsäuren zu oxydieren (wie aus der Kaliprobe ersichtlich ist). B. *pyozyaneus*, B. *fluorescens liquefaciens* und B. *prodigiosus* sind starke Lipolytiker; sie üben auch auf Fette eine geringe oxydative Wirkung wie aus der Aldehydbildung in fetthaltigen Nährmedien und Steigerung des Säuregehalts der Wasserphase ersichtlich ist. B. *butyri II* vermag ebenfalls Glyzerin zu oxydieren, auf Fettsäuren dagegen übt er keine Wirkung aus (farbloses Wachstum auf Endoagar ohne Laktose mit emulgierter Oleïnsäure). Schimmelpilze (*Sterigmatocystis*

nigra, Citromyces Pfefferianus, Mucor racemosus) neben der stark lipolytischen Wirkung weisen auch eine geringe oxydative Wirkung (betreffs Glyzerin) auf.

In der 34 nichtlipolytische Arten umfassenden Gruppe (niedrige Säurezahl, negative Kali- und Nilblauproben) kommen auch einige Unterschiede in ihrem Verhalten gegen Fette in Betracht. So z. B. bewirkt die Subtilis-Gruppe und einige Kokkenarten die Klärung des Milchagars, während Hefen darauf wachsen, ohne das Nährsubstrat zu ändern — dieser Effekt scheint also, wie erwähnt, teilweise von proteolytischen Eigenschaften der Mikroorganismenart abzuhängen. B. butyri I weist eine gewisse oxydative Wirkung auf (Steigerung des Säuregehalts der Wasserphase, positiver Ausfall der Reaktion von Schiff auf dem Endoagar ohne Laktose mit emulgiertem Soyaöl und auf demselben Agar mit Glyzerin, Trübung bei der Kaliprobe). Peroxyde aber konnten wir in Kulturen dieser Art nicht nachweisen.

B. lactis aerogenes dagegen bildet rasch in seinen fetthaltigen Kulturen Peroxyde und Aldehyde; wasserlösliche Säuren aber kommen dabei nicht zur Beobachtung, wahrscheinlich wegen ihrer raschen Zerstörung, die in direkten Versuchen leicht nachweisbar ist, ebenso wie die Vergärung des Glyzerins. Da B. lactis aerogenes keine lipolytische Wirkung ausübt, müssen wir annehmen, daß die Oxydierung der Fettkomponente auch ohne die vorläufige Spaltung der Fette möglich ist, wie wir es auch in unseren Untersuchungen über das Verhalten der Fette gegen äußere Einflüsse beobachten konnten.

Versuche mit Penicillium glaucum.

Um die Wirkung der lipolytischen Mikroben näher zu charakterisieren, haben wir mit einem Vertreter der Bakterienarten dieser Gruppe, namentlich B. pyozyaneus und einem der Schimmelpilze, namentlich Penicillium glaucum, ausführliche Versuche angestellt. Dazu wurde die betreffende Art in flüssigen mineralischen Nährböden gezüchtet, wo Soyaöl die einzige Kohlenstoffquelle war (KNO_3 = 0,5%, KH_2PO_4 = 0,1%, $MgSO_4$ = 0,1%, $CaCl_2$ = 0,1%, Spuren von $FeSO_4$ und NaCl). Die Flüssigkeit, deren p_H = 6,5 betrug, wurde in flachen Kolben von Winogradski (in der Menge von 7,8 ccm) sterilisiert und dann mit 10 ccm des sterilisierten Soyaöls versetzt, eine Menge, die nicht die ganze Oberfläche bedeckte, so daß der freie Zutritt des Sauerstoffs gesichert war. Da die chemische Analyse nach unserem Schema nicht weniger als 60 ccm erfordert, wurden 8 solche Kolben je mit 0,5 ccm der Emulsion der Penicillium-Sporen beimpft, andere nicht beimpfte dienten als Kontrolle. Die gesamten Proben wurden im Dunkeln bei 15° C während 27 Tagen aufbewahrt. Das sichtbare Wachstum begann am 3. Tage, die Sporenbildung nach 6 Tagen. Nach 27 Tagen, am Ende des Versuchs, wurde das Myzel vorsichtig in eine Petrischale übertragen, das Öl und die Wasserschicht aller Versuchskolben (ebenso wie der Kontrollkolben) im Scheidetrichter voneinander getrennt; die betreffenden Kolben wurden sorgfältig mit dem Äther gewaschen und das ausgewaschene Öl zur betreffenden Ölportion zugesetzt, ebenso wie das aus dem Myzel selbst, nach dessen Verteilung in kleine Stückchen mit Äther ausgewaschene Öl. Die auf diese Weise erhaltene Ätheröllösung wurde mittels Scheidetrichters vom Wasser befreit und in ein trockenes Glas von bestimmtem Gewicht übertragen, worin der Äther auf dem Wasserbade bei

35° abgedunstet wurde. Die Abnahme des Gewichts betrug 12% des ursprünglichen Gewichts des Öls. Die Tab. 1 ergibt die Resultate der Analysen der Fett- und der Wasserphase.

Tab. 1. Wirkung des **P e n i c i l l i u m g l a u c u m** auf das Sojaol.

	Fettphase									Wasserphase			
	Konsistenz	Geruch und Geschmack	Oxysauren	Peroxyde	R. von Kreis	R. von Schiff	Saurezahl	Verseifungszahl	Jodzahl	Oxyd[illegible]	R. von Kreis	R. von Schiff	Glyzerin
Kontrolle . .	flussig	normal	0,15	0,0014	—	—	2,5	196,5	142,0		—	—	—
Versuch . .	halbflussig	ranzig	0.33	0,0007	+	+	30,9	191,5	142,0	673	+	+	+

Wie aus der starken Abnahme der Gesamtmenge des Öls und der starken Bildung freier Fettsäuren ersichtlich ist, hat **P e n i c i l l i u m** während 27 Tage eine intensive Lipolyse bewirkt. Um seine Wirkung auf die Fettkomponente näher zu erörtern, haben wir einige Versuche mit der Oleïnsäure und mit dem Glyzerin an Stelle des Soyaöls angestellt; übrigens war die Versuchsanordnung unverändert. Das Wachstum des **P e n i c i l l i u m s** in unserem mineralischen Nährboden mit der Ölsäure, als einziger Kohlenstoffquelle, begann am 4. Tage und hatte das eigenartige Aussehen: die zarte Haut des Myzels entwickelt sich regelmäßig kreisartig an der Grenze der Oleïnsäure und des Wassers und bildet später eine hautartige Decke über die Oleïnsäure; während der Sporenbildung entwickeln sich die Sporen nur an der Peripherie, so daß das Wachstum als ein weißer, grün umrandeter Kreis erscheint. Nach 1 Monat wurden die Analysen ausgeführt, die in der Tab. 2 wiedergegeben sind.

Tab. 2. Wirkung des **P e n i c i l l i u m g l a u c u m** auf die Oleinsaure.

	Farbe	Geruch und Geschmack	Oxysauren	Peroxyde	Pyrogallolprobe	R. v. Kreis	R. v. Schiff	Jodzahl
Kontrolle am Anfang des Versuches	schwach gelblich	normal	0,2	0,0026	—	—	—	90,9
Kontrolle am Ende des Versuches	schwach gelblich	schwach ranzig	0,4	0,027	+	++	++	90,7
Versuch	zitronengelb	schwach ranzig	0,4	0,0124	+	+	+	90,7

Im dritten Versuch dieser Serie wurde an Stelle der Oleïnsäure das Glyzerin unter denselben Verhältnissen geprüft. Das Wachstum des **P e n i c i l l i u m s** begann am 3. Tage, die Sporulation nach 8 Tagen. Die Tab. 3 ergibt die Resultate der Analyse des 1 Monat langen Versuchs.

Tab. 3. Wirkung des Penicillium glaucum auf das Glyzerin.

	Glyzerinmenge %	Säuregrad nach Torner für gesamte Säuren	flüchtige Säuren	Dioxyaceton	R. v. Schiff
Kontrolle	5%	7,0	0	—	—
Versuch	3,5%	23,0	1,8	—	—

Bei der Berücksichtigung dieser 3 Tabellen ist ersichtlich, daß die Oleïnsäure (und wahrscheinlich auch andere ungesättigte Fettsäuren) unter der Wirkung des Penicilliums keine merkliche Oxydation erleidet. da die Änderungen kaum von denen zu unterscheiden sind, die in der Kontrolle während 1 Monats (also unter Einwirkung der Luft) eingetreten sind. Das Glyzerin wird dagegen vom Pilz rasch zerstört, und zwar unter Bildung der Aldehyde und der Säuren, die teilweise flüchtig sind. Dioxyacetonbildung konnte nicht konstatiert werden. Bei der Wirkung des Pilzes auf das Soyaöl haben wir es also hauptsächlich mit der Lipolyse und mit der nachfolgenden Vergärung des freigemachten Glyzerins zu tun.

Versuch mit dem B. pyozyaneus.

Da diese Art die Fähigkeit besitzt, Nitrate bis zum gasförmigen Stickstoff zu reduzieren. wurde in dieser Versuchsserie das KNO_3 weggelassen und $(NH_4)_2PO_3$ als N-Quelle angewendet; der p_H des Nährmediums betrug 7,0. Die Tab. 4 gibt die Zusammenfassung eines 1 Monate langen Versuches.

Tab. 4. Wirkung des B. pyozyaneus auf das Sojaöl.

	Farbe	Geschmack	Geruch	Säurezahl	Jodzahl	Verseifungszahl	Oxysäuren	Peroxyde	R. v. Kreis	R. v. Schiff	Glyzerin
Kontrolle	normal	normal	normal	2,5	139,0	199,85	0,26	0,0011	—	—	—
Versuch	normal	ranzig	ranzig	45,8	138,0	190,64	0,25	0,0014	—	—	—

Im analogen Versuch mit dem Glyzerin an Stelle des Soyaols erwies es sich, daß während 20 Tage 2% des Glyzerins vergärt worden sind unter Bildung von Säuren. Dioxyazeton und Aldehyde konnten wir dabei nicht nachweisen. Es folgt daraus, daß die Wirkung des B. pyozyaneus auf das Soyaöl, ebenso wie die des Penicilliums, hauptsächlich lipolytisch ist: die oxydative Wirkung dagegen ist wenig ausgeprägt und bezieht sich vorzugsweise auf das Glyzerin.

Eine Anzahl von Arten wurden ferner auf ihr Verhalten gegen Fette und Öle in einer anderen Versuchsanordnung geprüft, und zwar B. coli, B. lactis aerogenes, B. implexus, B. mesentericus vulgatus, Micrococcus cremoïdes, M. lipolyticus, M. cereus flavus. So wurde in einer Versuchsserie die 24 Std. alte Kultur der betreffenden Art auf dem schrägen Fleischpeptonagar mit sterilem Soyaöl überschichtet; in einer anderen Versuchsserie wurden dieselben Arten in das Peptonwasser mit 5% Soyaöl geimpft; nach 5—10 Tagen bei 37° wurden die Reaktionen von Schiff und Ditz (Peroxydnachweis) ausgeführt. Es erwies sich, daß die Reaktion von Schiff in allen Kul-

turen positiv ausfiel (Kontrolle negativ!); die Peroxydreaktion dagegen fiel nur für den B. lactis aerogenes positiv aus. Diese schon oben bei der Bewertung der Kaliprobe kurz erwähnte Tatsache ist zweifelsohne vom praktischen Standpunkte aus wichtig. Es sei hier daran erinnert, daß die an B. lactis aerogenes reichen Kumysproben immer den talgigen Geruch und Geschmack haben, worauf wir in unseren Kumysstudien 1922 hingewiesen haben; die mit Reinkulturen hergestellten Kuhbutterproben, die in unseren Versuchen monatelang im Dunkeln in gut verschlossenen Gefäßen aufbewahrt wurden, wurden bei Anwendung des B. lactis aerogenes ganz weiß und talgig. Fette erleiden also unter der Wirkung dieser Art dieselben Veränderungen wie durch äußere Einflüsse, z. B. Licht und Sauerstoff. B. lactis aerogenes auf Endoagar ohne Laktose mit emulgiertem Soyaöl färbt die Platte intensiv rot, während Kontrollplatten farblos bleiben; dasselbe geschieht, wenn an Stelle des Soyaöls die Oleinsäure angewendet wird; nach ein paar Tagen wird die Kultur des B. lactis aerogenes auf diesem Nährsubstrat wieder farblos, was natürlich auf die weitere Oxydation der gebildeten Aldehyde zurückgeführt werden muß. Es sei hinzugefügt, daß in Kulturen des B. lactis aerogenes in Peptonwasser mit 5% Oleinsäure ebenfalls Peroxyde nachgewiesen wurden.

Was nun die Wirkung der geprüften Arten auf das Glyzerin anbetrifft, so wurde sie einerseits in der Bouillon mit 5% Glyzerin, anderseits auf dem Endoagar ohne Laktose aber mit Glyzerin untersucht. Im ersteren Nährmedium rufen nur B. lactis aerogenes und B. coli eine intensive Säure- und Gasbildung hervor, auf dem zweiten wird die Rotfärbung von denselben 2 Arten und auch von B. implexus, B. mesentericus, M. crenoïdes bewirkt; die Kulturen des M. cereus flavus und auch des B. pyozyaneus blieben dagegen farblos, was im Einklang mit den obigen Angaben über Pyozyaneus-Kulturen in mineralischen Nährsubstraten mit Soyaöl und auch mit Glyzerin steht.

Versuche über die Mikrobenlipase.

Das fettspaltende Ferment wurde in Pilz- und Bakterienkulturen schon mehrmals nachgewiesen. So fanden Gerard (15) und Camus (16) die Lipase beim Penicillium glaucum und Aspergillus niger, Spieckermann und Bremer (18) beim Aspergillus flavus, Laxa (14) beim Mucor und Penicillium, Garmér bei der Sterigmatocystis nigra, Biffen (17) bei einer Pilzart, die er auf Kokosnüssen gefunden hatte. Für Bakterienarten sollen in dieser Hinsicht B. pyozyaneus und B. fluorescens liquefaciens genannt werden, auch B. prodigiosus, Staphylococcus pyogenes aureus (Ejkman), B. tuberculosis (Carrière, Michaelis und Nakahara), B. punctatum (Söhngen), eine Torulaart (Söhngen) und andere.

In unseren Versuchen, die mit dem Penicillium und dem B. pyozyaneus ausgeführt wurden, bemühten wir uns, folgende Fragen zu beantworten: 1. gehört die Lipase der Pilze zu den Endo- oder Exofermenten, 2. wie verhält sich die Mikrobenlipase gegen Erwärmung?

Um die erstere Frage zu erörtern, wurde das Myzel der 1 Monate alten Kultur des Penicilliums mit Äther und destilliertem Wasser gewaschen, dann bei 37° getrocknet und mit Glaspulver verrieben. Das Pulver wurde 12 Std. mit destilliertem Wasser extrahiert und der Extrakt durch die Kerze filtriert. Dieser Extrakt aber wies keine lipolytische Wirkung

auf. In der Voraussetzung, daß die Lipase in diesem Versuche teilweise beim Trocknen unter Luftzutritt zerstört, teilweise beim Filtrieren adsorbiert wurde, trockneten wir das Myzel in einem anderen Versuche sub vacuo und versetzten ihn ohne ihn zu filtrieren mit Toluol. Wurde dieser Extrakt, der sich bei den Kontrollaussaaten als steril erwies, mit dem Soyaöl versetzt, so wurde nach 2 Tagen eine nicht unbeträchtliche Zunahme des Säuregehalts der Fettphase beobachtet; es ist damit gezeigt, daß das Myzel die Lipase enthielt, die also zur Gruppe der Endofermente gehört. In der Kultur selbst, nach Entfernung des Myzels, gelang der Nachweis der lipolytischen Wirkung nicht.

Die Versuche mit der Pyozyaneus-Lipase hatten den Zweck, ihr Verhalten gegen Erwärmen zu prüfen. Es sei hier bemerkt, daß die Bestimmung der Steigerung des Säuregehalts in der Fettphase des zugesetzten Fettes bis jetzt die einzige Methode für den Nachweis der Lipase ist: unsere „raschen" Proben, namentlich die Kali- und die Nilblauprobe, erweisen sich wegen ihrer relativ schwachen Empfindlichkeit dazu als unzuverlässig. Um die Lipase in unseren Kulturen nachzuweisen, wurden sie (namentlich die 4tägige Kultur des B. pyozyaneus im oben besprochenen mineralischen Nährboden mit 4% Soyaöl) mit Toluol abgetötet (2 ccm des Toluols für 30 ccm der Kultur, 2tägige Wirkung), dann wurde das Toluol entfernt. Für den Nachweis der Lipase wurden 20 ccm der sterilen (resp. durch vorläufige Aussaaten kontrollierten) Flüssigkeit mit Soyaöl versetzt und tagelang bei 37° aufbewahrt; die ursprüngliche Säurezahl, die 8,1 mg betrug, stieg nach 5 Tagen bis 8,4, nach 11 Tagen bis 14,5.

Die Versuche über die Thermostabilität der Pyozyaneuslipase zeigten, daß sie sogar nach 30 Minuten langem Erwärmen bei 70° erhalten blieb, nach 20 Minuten langem Erwärmen bei 90° wurde sie nur teilweise zerstört. Es soll hier daran erinnert werden, daß Söhngen ebenfalls die Widerstandsfähigkeit der Lipase gegen hohe Temperaturen konstatieren konnte; die Lipase von B. pyozyaneus, B. fluorescens liquefaciens, B. punctatum, B. liquefaciens albus wurde in seinen Versuchen sogar, nach 5 Minhten langem Kochen bei 100° nicht völlig zerstört. Was nun die optimalen p_H-Werte für die Wirkung der Lipase anbetrifft, so scheinen sie etwa zwischen 7,0 und 7,5 zu liegen. In Versuchen von Söhngen wirkte der Zusatz von Milchsäure oder vergärbaren Stoffen wie Zucker oder Alkohole, auf die Lipase einiger Bakterienarten hemmend; in unseren Versuchen über die Lipase des B. pyozyaneus kam deren Wirkung bei p_H 5,0—6,0 gar nicht in Betracht. Es folgt aus diesen Angaben, daß beim Vorhandensein zahlreicher lipolytischer Mikroben im fettreichen Nährmedium die nachfolgende Pasteurisation nicht imstande ist (falls das Nährsubstrat nicht sauer ist), dem weiteren Verderben resp. der weiteren Lipolyse vorzubeugen.

Zusammenfassung.

1. Die Fähigkeit, Fette und Öle zu spalten, kommt zahlreichen Pilzen (Penicillium, Aspergillus, Sterigmatocystis u. a.) und zahlreichen Bakterienarten (B. pyozyaneus, B. fluorescens liquefaciens, B. prodigiosus, B. cloacae, B. galleriae, B. viscosus sacchari, B. butyri II, M. cremoides, M. lipolyticus, Sarcina lutea, im schwächeren Maße der Subtilis-Gruppe) zu.

2. Die von Mikroben bewirkte Lipolyse wird hauptsächlich durch die

starke Steigerung der Säurezahl der Fettphase gekennzeichnet; das Glyzerin dagegen ist wegen seiner leichten Gärbarkeit niemals in Kulturen nachweisbar.

3. Als einfaches und rasches Verfahren zum Nachweis der lipolytischen Wirkung der Bakterien sind die sog. Kaliprobe und die Nilblauprobe zu empfehlen, die auf Fettagarplatten ausgeführt werden.

4. Außer der Lipolyse vermögen einige Mikroben Fette und Öle durch Oxydation zu zerstören, analog der Wirkung von Licht und Sauerstoff; diese Eigenschaft aber scheint weniger in der Mikrobenwelt verbreitet zu sein als die lipolytische. Als Bakterienarten, die Fette oxydieren, sollen in erster Linie B. lactis aerogenes, B. viscosus sacchari und B. butyri I genannt werden. B. viscosus sacchari übt auch lipolytische Wirkung aus.

5. Die Oxydation der Fette und Öle durch Mikrobenwirkung (ebenso wie die Wirkung des Lichtes und des Sauerstoffs) wird durch folgende Merkmale gekennzeichnet: Bildung von Peroxyden, Oxysäuren, Aldehyden, Vorhandensein von labil gebundenem Sauerstoff, Steigerung der Säurezahl, der Wasserphase (infolge der Bildung wasserlöslicher niedrigmolekularer Säuren mit höherem Neutralisationskoeffizient), Abnahme der Jodzahl, Steigerung des refraktometrischen Index. Es ist bemerkenswert, daß die Oxydation der Fettsäuren und des Glyzerins auch ohne vorhergehende Lipolyse auftreten kann.

6. Als einfache und rasche Methoden zum Nachweis der stattgefundenen Oxydation der Öle sind, neben den schon bekannten Proben zum Nachweis des labilen Sauerstoffs auch die von uns angegebene Pyrogallolprobe und die sog. „biologische Probe", sowie die Züchtung der zu prüfenden Art auf Endoagar ohne Laktose mit emulgiertem Soyaöl zu empfehlen.

7. Die Lipase der Pilze, ebenso wie das oxydativ wirkende Ferment (das wir als „Lipoxydase" bezeichnen) ist im Nährmedium nicht nachweisbar; im Myzel dagegen läßt sich die Lipase nachweisen. Die Lipase der Bakterien, z. B. des B. pyozyaneus, ist thermostabil.

Literaturverzeichnis.

1. Issoglio, Ann. de Chimie Appliquée. T. 18. 1916. — 2. Fahrion, Chem. Umschau. Bd. 16. 1920. — 3. Taffel et Revis, Les matières grasses. Nr. 277, 278, 279. — 4. Großfeld, Ztschr. f. Unters. d. Lebensmittel. 1928. S. 55, 374, 376. — 5. Müller, Ztschr. f. klin. Med. Bd. 21. 1887. — 6. Gottstein, Berliner klin. Wochenschr. Bd. 907. 1887. — 7. Krüger, Ztschr. f. Bakt. Bd. 7. 1890. S. 87. — 8. v. Sommaruga, Ztschr. f. Hyg. Bd. 18. — 9. Schmidt, Ztschr. f. Hyg. Bd. 18. — 10. Rubner, Arch. f. Hyg. Bd. 38. — 11. Schreiber, Arch. f. Hyg. Bd. 38. — 12. Reinmann, Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 6. S. 131. — 13. Jensen, Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 8. S. 1. — 14. Laxa, Arch. f. Hyg. Bd. 49. 1902. — 15. Gérard, C. R. Acad. d. Sc. T. 124. 1897. p. 370. — 16. Camus, C. R. Soc. d. Biol. 1897. p. 192 u. 230. — 17. Biffen, Ann. of Botany. 1899. — 18. Spieckermann und Bremer, Landwirtschaftl. Jahrb. 1902. — 19. Tissier et Martelly, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1902. — 20. Carrière, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 29. S. 953. — 21. Ejkman, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 29. S. 22. — 22. Achalme, Ann. de l'Inst. Pasteur. 1902 und 1903. — 23. Rogers, Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 12. 1904. S. 388. — 24. Rahn, Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 15. S. 422. — 25. Haag, Arch. f. Hyg. Bd. 100. 1928. H. 5 bis 7. — 26. Huß, Zentralbl. f. Bakt. Bd. 20. S. 474. — 27. Horowitz-Wlassowa und Livschitz, Untersuchung über den Schweinepokelfleischschleim. Nachr. d. wiss. Lebensmittel-Inst. 1931 (russisch). — 28. Horowitz-Wlassowa und Livschitz, Fettspaltende Bakterien. Ebenda. — 29. Sseliber, Monogr. in Arch. d. Inst. von Lesshaft. 1926 (russisch). — 30. Plotkina, Ebenda. Bd. 25. 1929. H. 1 u. 2. — 31. Netschaïewa, Ebenda. Bd. 4. 1931.

Nachdruck verboten.

The Microbiology of Certain Canned Meat Products.

[Department of Bacteriology, University of Illinois, Urbana, Illinois.]

By **E. H. Ruyle** and **F. W. Tanner.**

The art of food preservation by canning has experienced rapid development in the United States during the last three or four decades. Meat products constitute a considerable portion of foods preserved by canning and their microbiology has become of considerable interest and importance. Spoiled canned products are examined bacteriologically for information which may help to prevent recurrences of the spoilage and sound products to determine the characteristics of any bacteria which may have survived processing. Possible presence of viable organisms capable of producing spoilage or rendering the food injurious to health, must always be considered. Furthermore, understerilized containers are subject to spoilage during storage. Results of comprehensive studies on individual food products have not been reported to any extent. In some instances meats were included in a study of various canned foods but the investigations were not carried out primarily to secure information on them. The time has now arrived when each separate food product should be examined on a large enough scale to permit more accurate conclusions. Conditions of preparation and packing are now quite different than they were when earlier investigators reported their work. Factories are subjected to more careful inspection and process times and temperatures are now based upon results secured from bacteriological examination of both commercial and inoculated packs. Consequently, quite a different situation may exist today then is indicated by data in earlier reports.

Historical.

Vaillard (1900) (1) believed that from seventy to eighty per cent of apparently sound cans of food destined for use of the French army harbored viable microorganisms. He further believed that bacteria which escaped sterilization could survive in such cans for from 5 to 7 years. He claimed to have revived these dormant bacteria by making small openings in the cans through which air could enter. With this technic strict anaerobes were never found. Among the spore formers were Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus, and others; non-spore forming bacteria were like Proteus vulgaris and Bacterium termo. Such manipulation of the container may be looked upon with some suspicion today. While the contamination explanation should be used with caution, the diversity of bacterial types reported by Vaillard suggests possible introduction of extraneous forms. Manipulation of the can of food from which specimens for bacteriological examination are to be withdrawn, is a much more difficult matter than some have believed it to be. This subject is discussed later in this paper. Canned meats for the Bavarian army were studied by Deichstetter (1910) (2). With the exception of two cases where the cans had been previously considered to be suspicious, no living bacteria were encountered. Samples from private plants were also found to be sterile. All cans were incubated at 22° C. to 37° C., before examination. Pfuhl (1904) (3) examined 106 samples of canned meat products and isolated viable bacteria from 29 of them. Six cans swelled after from 8 to 14 days incubation. Pfuhl employed about the same technic as did Vaillard but either had better products or manipulated the cans in such a way that introduction of extraneous forms was perhaps eliminated. Strictly anaerobic, gas producing bacteria were isolated from three cans which showed decided putrefactive changes. Pfuhl did not describe the bacteria other than to say that they were bacilli or micrococci. Cathcart (1906) (4) isolated Bacterium coli from swelled cans of sardines, salmon and beef. Unswelled cans believed to be sterile, swelled after inoculation with the

organisms isolated. McBryde (1907) (5) examined 10 leaking and 5 sound cans of meat by culturing the contents on agar plates and glucose agar shake cultures; one leaker was sterile while most of the others showed the presence of bacteria or molds. The organisms were believed to be Staphylococcus albus and citreus, Bacillus subtilis, Proteus vulgaris, Bacterium coli communis and a paracolon organism. Viable bacteria could not be isolated from the sound cans. Fowler (1909) (6) reported an organism quite similar to Bacillus putrificus coli from several swelled cans of meat. He recommended incubation of canned meats at 37° C., before shipment to the tropics.

Most of the results reported by earlier investigators concerned spoiled cans because spoilage was heavy and of considerable economic significance. Weinzirl (1919) (7), however, examined 1016 cans of various types of food products purchased on the market including 169 spoiled or suspected samples and 37 purposely underprocessed cans. Viable microorganisms were found in 179 or 23.0 per cent showing no external evidence of spoilage. Owing to their heat resistance, spore forming organisms were practically the only organisms isolated. Organisms of significance in food poisoning were not found. Presence of viable spores in 19.2 per cent of nonleaking cans was attributed to understerilization. Conclusions based on composites of various types of food products, are of questionable significance. Each particular type of food-product has its own characteristics and peculiarities and should be studied by itself. Spoiled meat products examined by Weinzirl included fish and crab and a single can of sausage, the latter proving to be sterile. Apparently sound products included corned beef, tongue, soup, and marine products. Eight of 16 cans of corned beef contained viable organisms. Numerous bacteria were identified and several new species reported. In addition to reporting that canned products containing viable spores do not necessarily spoil, Weinzirl showed that spores of aerobes did not develop under anaerobic conditions even when incubated at 37° C. (98,6° F.) for ten days. They germinated readily, however, when exposed to air. The presence of spores was attributed to understerilization rather than to leaking containers. Cheney (1919) (8) continued this work at Harvard University. Fifty eight or 8 per cent of 725 canned food products examined were found to contain viable microorganisms, the incidence of infection varying somewhat with each particular food. The products examined included meats, fish, fruits, and vegetables. Duplicates from the same pack were avoided since different brands were obtained from different stores at vaying times over a period of five months. All cans were held in an incubator (37° C.) from one to six weeks. Smith fermentation tubes containing one per cent dextrose broth and a small cube of meat tissue served to permit development of both aerobic and anaerobic gas formers and thermophiles. The stricter anaerobes were sought by submerging a specimen in a test tube under about two inches of one per cent dextrose agar and incubating for five days.

Seven of the 39 cans of sausage, 7 of 40 cans of corned beef, and 4 of 45 cans of chicken contained viable organisms. They were isolated without exception in pure culture. This work was continued until about 2200 cans had been examined. In a personal communication to one of the authors, Cheney stated that qualitatively the results were unchanged, but among higher grades examined the percentage of cans containing living organisms was markedly decreased, while in lower grades of the same product it was proportionally higher.

Another comprehensive investigation of canned meat products was carried out by Savage, Hunwicke, and Calder (1922) (9) who examined 116 cans of meat, 207 of marine products imported into England, 94 unsound samples and 22 shop or commercial samples. The products were chiefly corned beef with a few cans of mutton and tongue. Fourteen (63.6%) of the 22 commercial samples were infected. Comparative unsterility of sound samples, nearly all of which were incubated for several weeks at 37° C. (98.6° F.), was attributed to the presence of sporing aerobic bacilli, thermophilic bacilli, and micrococci. Strict anaerobes were not found in the sound samples, but seven sporing aerobes, six thermophiles, and five micrococci were isolated.

Savage emphasized the importance of leaky cans — "not as sources of infection but as sources of oxygen which light up and set into activity already existing but dormant bacteria". Although this idea persists through the literature on canned food bacteriology its significance is questionable. Bacteria in the center of a solidly packed can of meat would not be readily aerated. The most active destroyers are also anaerobes, the growth of which would be inhibited by air. Savage also advanced the opinion that aerobes must be present in large numbers if they are to produce

sufficient enzymes to break down the protein necessary for food. Those present in very small numbers thus remain dormant as spores.

Bidault (1924) (10) did not agree with Savage on the consequences of the entrance of air into a can. He quoted an experiment carried out by Pfuhl to show the importance of outside contamination. He filled cans of different sizes with meat inoculated with a culture of an organism which resisted 100° C. for one and one-half hours. Bacteriological examination of the cans showed that all were sterile. At the end of two weeks, however, a few leaked and showed signs of microbic development. Cocci, some nonsporulating bacteria, and a spore forming bacterium, the spores of which did not resist a temperature of 100° C. for one minute, were isolated. It was concluded that in this case, at least, all the microbes came from the exterior and had been carried by the air. Bidault was also of the opinion that sterilization must be thorough since, according to the experience of his laboratory, only well processed products do not spoil. The role of anaerobes was particularly emphasized. Their frequency in the intestines of herbivorous animals, on the skin, and in manure is undoubtedly responsible for much contamination of meat exposed in slaughter houses. Bacteriological studies also show that in the majority of cases cans swell under the influence of organisms capable of developing without air.

Recently Forgeot, and Goldi (1932) (11) reviewed modern investigations on bacteria in canned meats and the biological condition effecting their activity. They concluded that viable bacteria occasionally escape the effects of processes, even though they may be severe and generally considered to be adequate. This is due to slow heat penetration, to heat resistance of some species, and other factors.

Walsh (1932) (12) described a spore forming anaerobic bacillus isolated from a swelled can of meat the spores of which resisted live steam for over five hours. The organism was markedly sensitive to salt, sterility being attained after two hours when the salt content was raised from 2.75 to 4 per cent.

Streptococci were discovered in considerable numbers in canned Russian herrings recently analyzed by D. Thornton (13), Great Britain. His results are interesting in view of the recent developments in knowledge of microorganisms in canned meat products.

Several facts are brought out by this survey of the literature. First, canned meat products show appreciable incidence of viable bacteria. Secondly, these viable bacteria frequently do not germinate and spoil the food even though it may be stored under seemingly favorable conditions. Thirdly, bacteria, such as cocci, ordinarily considered to be non-heat resistant, have frequently been found in containers which have been processed at temperatures and for times which would generally be considered to be quite adequate. Fourthly, few bacteriologists who have examined canned meat products have given consideration to the condition of the container. Obviously bacteriological data from containers with faulty seams should not be given much consideration. Significant variations in packing practice should also be borne in mind in interpreting data which have been published.

Experimental.

The technic used in this investigation was that usually used in bacteriological studies of canned foods. It has, in general, been reviewed by Tanner (14). The samples were secured by purchase on the open market and from individuals who were engaged in food control work. They represented the products which were being distributed to the retail trade. The samples were divided into two lots in order to secure information before and after storage. Those which were not opened immediately on receipt, were held at room temperature for from three to six months in order to simulate as closely as possible actual commercial conditions. The storage period extended over the hottest time of the year for it was believed that dormant bac-

teria might germinate and either produce spoilage or develop into sufficient numbers to be more easily detected. The following samples were studied.

(1) 379 samples of various products examined soon after receipt.

(2) 199 samples stored for from 3 to 6 months.

(3) 43 samples regarded as suspicious for various reasons and opened for immediate bacteriological examination.

Although this investigation was primarily bacteriological in nature, chemical determinations were made on a considerable number of cans of cured meat products for information on salt, nitrate, nitrite, moisture and hydrogen ion concentration. The results of this work are shown in Table I. The concentration of these agents may have much to do with the behavior of bacteria in meat products. Individually, with the exception of salt, they may not exert much effect, but together they may determine whether spoilage will occur and its type (Tanner and Evans) (15). The other observations consisted of determination of the condition of the container, the size of the can and weight of the contents, the type of product, condition of the contents immediately after opening and the process used. Nitrate determinations were made on selected products.

Table I.

Product Examined	Chloride			Nitrite	Moisture			pH		
	Low	Aver.	High		Low	Aver.	High	Low	Aver.	High
Tongue (6 lb. can)	2.58	3.40	4.78	0—1 p.p.m.	43.30	48.86	58.90	6.4	6.6	6.8
Tongue (6—20 oz.can)	1.48	2.86	4.17	0—1	40.70	53.95	66.10	6.4	6.6	6.8
Sausage	1.37	1.80	2.14	0—Trace	48.80	57.95	71.00	6.0	6.5	6.8
Vienna Sausage	1.56	2.17	3.98	0—1	58.10	65.59	73.10	6.0	6.4	6.8
Liver Hash	.58	.63	.71	0	70.40	71.85	73.30	6.2	6.2	6.2
Corned Beef Hash	.12	1.18	2.16	0—Trace	62.40	70.18	74.50	6.0	6.4	6.8
Roast Beef	.51	1.18	2.16	0	54.10	59.23	69.20	6.0	6.4	6.8
Corned Beef	2.81	3.23	3.74	Trace	56.10	57.88	59.70	6.2	6.2	6.2
Deviled Tongue	1.96	2.08	2.16	0	61.00	61.95	62.80	6.6	6.6	6.8
Potted Meat	.65	1.78	4.29	0—Trace	39.00	64.20	72.80	6.2	6.6	7.0
Chili-con-carne	.71	.91	2.03	0	65.40	70.50	75.60	6.2	6.4	6.8
Tripe	.12	.52	.91	0	73.60	80.37	93.00	6.0	6.6	7.0
Boned Chicken	1.05	1.43	1.83	0	59.70	63.20	67.80	6.0	6.4	6.6
Chicken-a-la-king	.94	1.02	1.11	0	70.90	78.26	80.40	6.4	6.6	6.8
Brain	.19	.89	1.83	0	65.30	70.42	72.00	6.4	6.6	6.8
Meat & Veg. Stew	1.24	1.44	1.71	0	81.20	88.20	92.40	6.0	6.4	6.8
Chicken Soup	1.37	1.51	1.63	0	95.40	90.20	97.00	6.4	6.6	6.8
Spiced Ham Nitrate Low Aver. High .09% .11% .14%	3.10	3.42	3.76	1—2.5	61.30	64.20	69.90	6.2	6.4	6.6

Before opening, all cans were incubated at 37° C. for several days to encourage development of any microorganisms which might be present in small numbers. After such incubation the cans were cleaned, washed with 5 per cent phenol, dried and opened. The instrument with which the container was opened, (see Tanner) (14), cut a one inch circular disc of tin from the center of the cover. Through this aperture was inserted a sterilized cork-borer or metal tube which was pushed to the bottom of the can. A plug of meat weighing about 15 grams was thus removed from that part of the can where viable bacteria would most likely be found. Several cy-

linders of meat were obtained in this manner for bacteriological examination. One specimen was placed directly in culture media and another in a tube containing sterile water. Cultural examination involved enrichment in liquid media followed by plating and study of pure cultures. The cultures were incubated aerobically and anaerobically at 37° C. and 55° C. Sheep brain medium prepared by mixing one part of ground sheep brains in two parts of water, pork infusion broth and peptic digest medium proposed by Stickel and Meyer (16) were used for enrichment of anaerobic bacteria. Other media usually used in bacteriology laboratories were also used.

Special precautions were used to insure sterility of apparatus and media. Since this investigation involved the study of heat resistant bacteria, especially long sterilization times were used for media and apparatus. Plates were poured and cultures frequently made to check the sterility of media and glassware. All media were incubated before use as an added precaution.

After the samples had been removed, the cans were further opened by cutting around the cover about a centimeter from the seam. The contents were then removed for chemical examination and the can thoroughly cleaned without disturbing the double seam. The cleaned dried cans were then stripped and disassembled to determine presence of faulty seams and leaks. We are indebted to Mr. L. E. Nugent for this work. Analyses of the results of bacteriological examination of canned foods which do not consider the condition of the container are, in many cases, quite meaningless. Furthermore, such examination must be made by experts in can structure.

Since results of studies on various canned food products should be discussed for each separate product and not as a whole, the data secured are given below.

Tongue (6 lb. cans): Thirty-one cans of tongue were examined. They had been processed at 104.4° C. (220° F.) for from 210 to 240 minutes. These processes are low in sterilizing value when compared to those given other meat products because of the low processing temperature and slow rate of heat penetration through the product. Three cans contained viable organisms. Three thousand spore forming bacteria per gram of meat were present in one can, the contents of which was normal as far as odor and appearance were concerned. The container in this case had swelled but was found to possess satisfactory seams. A soured[1]) sample opened immediately after swelling, was found to have a mixed flora of rods with and without spores and micrococci to the extent of 2000 organisms per gram. A third swelled can opened as soon as it was received had 5 aerobic spore forming rods per gram. Ten of the cans were soft swells which condition may have been due to over-filling. Five of the cans were found to have faulty seams while the seams of the other five were satisfactory.

Tongue (2—20 oz. cans): Two of 54 smaller cans of tongue contained viable organisms. One swelled can examined immediately had soured; the meat was found to have 2000 bacteria per gram, consisting of spore-forming aerobes, rods without spores, micrococci and facultative thermophiles (spore formers). A pure culture of aerobic spore forming rods was also obtained from one of the stored sound cans. Although the can and contents appeared normal, the meat contained 90 bacteria per gram. Twelve 2¾ oz. cans of deviled tongue processed for 105 minutes at 103.3° C. (218° F.)

[1]) Sour as used in this paper refers to an acid-like odor and not to putrefaction as commonly used in the meat packing industry.

were found to be sterile. The results of chemical examination were in fair agreement. The chloride content varied from 1.48—4.17 most of the cans having about 2.86 per cent. Nitrites were present in a few cans to the extent of 1 p.p.m. The majority of cans, however, contained no nitrite. Moisture varied from 40.70 to 66.10 and the hydrogen ion concentration was 6.6.

Pork Sausage: Pork Sausage products were processed at about 115.6° C. (240° F.) for from 43 to 165 minutes. Five of 24 cans opened immediately after collection were not sterile. Two swelled cans, the contents of both of which had soured, gave aerobic counts of approximately 2000 per gram. Sporing aerobes, rods without spores, and micrococci were isolated. An obligate anaerobe, Bacillus sporogenes, was also recovered from one. Low counts were obtained from the three remaining apparently normal samples in this group. Twenty sporebearing bacteria and micrococci were isolated from one, two micrococci from another, and five spores found to be facultative anaerobic from the third. Unfortunately the empty cans in this series were lost in transit and no information is available regarding the seams.

Vienna Sausage: All cans of Vienna sausage were apparently in excellent condition. Four to 20 oz. cans were opened. These had been processed between 104.4° C. (220° F.) to 118.3° C. (245° F.) for from 43 to 165 minutes. Five of 84 were found to contain viable cells. No swelled cans were encountered in this group; the contents were in each case normal. All samples held at room temperature were found to be sterile.

Liver Hash: Micrococci, recovered from one of six cans of Liver Hash processed for 90 minutes at 115.6° C. (240° F.) were in pure culture. There was no indication of spoilage. The organisms were apparently dormant since incubation of the product previous to examination did not cause them to germinate.

Corned Beef Hash: Two of 61 cans of Corned Beef Hash contained viable organisms; one showed spore forming facultative anaerobic rods and the other spore forming aerobes. No organisms were recovered from the cans held for from 3 to 6 months at room temperature. The process varied from 113.3° C. (236° F.) to 124.4° C. (256° F.) for 150 to 54 minutes. None of the cans were swollen and the contents seemed to be normal.

Roast Beef: Approximately 10 micrococci per gram were recovered from one of 25 cans of roast beef which had been processed for 120 to 150 minutes at 115.6° C. (240° F.). No organisms were isolated from one soft swell although the container was found to be defective. The contents of both the swelled and infected can (sound) were perfectly normal. Six cans of corned beef, none of which were held in storage, were also sterile.

Potted Meat: The contents of 125 cans of potted meat products, selling under various trade names as Deviled Ham, Dainty Spread, and Sandwich Spread, were examined. Bacillus sporogenes, a putrefactive anaerobe, was recovered from one apparently normal sample; six other normal cans were infected with aerobes. One can contained 3 spore forming rods per gram, three others showed from 7 to 14 micrococci per gram in pure culture; another contained approximately 19 non-spore forming rods per gram, and one a mixture of aerobic spores and micrococci, totalling 10 per gram. Containers in each case were sound. The majority were processed at 115.6° C. (240° F.) although the process-range was from

111.1° C. (232° F.) to 123.9° C. (255° F.) for from 135 to 37 minutes. Cans held in storage proved to be sterile.

Chili-con-carne: Bacteriological examination showed one of 24 cans of chili-con-carne to contain viable spores. Aerobic rods without spores were recovered in pure culture. The sample was normal in appearance and was opened immediately upon arrival at the laboratory. Two processes were given, 60 minutes at 115.6° C. (240° F.) and 56 minutes at 130.5° C. (267° F.). All cans in this group were sound.

Tripe: Two of 30 sound samples of Tripe contained viable microorganisms; one with spore-forming aerobes and the other with non-spore-forming bacilli. The can infected with non spore-forming rods had been processed for 135 minutes at 115.6° C. (240° F.). Both cans from which viable organisms were isolated had sound seams.

Chicken: Twelve samples of boned chicken packed in glass and processed for 60 minutes at 115.6° C. (240° F.), and 12 samples packed in tin and processed for 120 minutes at 108.3° C. (227° F.), were sterile. Chicken-a-la-king, processed for 75 minutes at 115.6° C. (240° F.), also proved to be sterile. Half of the cans in each series were examined after storage as mentioned above.

Brain: Twenty-four cans of brains processed at two temperatures, 75 minutes at 115.6° C. (240° F.), and 135 minutes at 115.6° C. (240° F.) were found to be sterile. The contents of the cans were normal.

Meat and Vegetable Stew: Three spore-forming rods were isolated from one of 11 cans of meat and vegetable stew, a vegetable soup processed for 120 minutes at 108.8° C. (228° F.). No organisms were recovered from five of the cans held at room temperature. The containers in this group were also sound.

Chicken Soup: One of six cans contained viable non-spore forming rods. The contents of the can was satisfactory. This would seem to indicate that the organism present was not a potential spoilage organism or that the conditions in the can were particularly unfavorable to its development.

Spiced Ham: Since spiced ham products (luncheon loaf) are usually not given sterilizing processes, they should be considered separately. So-called spiced ham is cured before canning and may be, therefore, quite different from other meat products. Obligate anaerobes including Bacillus putrificus, Bacillus putrefaciens, and Bacillus multifermentans, were isolated from 19 normal cans of spiced ham; aerobic cultures made from 5 cans failed to show evidence of any organisms. Aerobic spore-formers, micrococci, facultative thermophilic spore forming rods and rods without spores were also isolated. Although each of the main types of organisms was isolated from 19 normal cans of spiced ham; aerobic cultures made from 5 cans failed to show evidence of any organisms. Aerobic spore-formers, micrococci, facultative thermophilic spore forming rods and rods without spores were also isolated. Although each of the main types of organisms was occasionally found in pure culture, in some cases it is entirely probable that still larger samples might have shown other types to be present.

Suspected Samples: Six pound cans of spiced ham, many of which were definitely sour (pH 5—5.4), did not show results essentially different from the normal product. Obligate anaerobes, Bacillus

putrificus, Bacillus tetanomorphus and Bacillus sporogenes, were isolated from 12 of 24 samples. Aerobic organisms were isolated from 20 of the cans including diplococci, spore forming rods, rods without spores, and facultative thermophilic organisms. No organisms were isolated from two of the cans. The meat from these samples, however, had a decided off-odor and would probably have been excluded from the diet.

Nine of 11 swelled cans including corned beef hash, lamb stew, sausage, etc., showed decided aerobic growth. Spore forming rods, all apparently in pure culture, were isolated. A strictly anaerobic organism, Bacillus putrificus, was also recovered from a putrid can of chicken-a-la-king included in the series. Two cans were sterile.

Eight suspected samples 3 to 4 years old proved to be sterile although 7 were swelled. Since the meat appeared to be normal, except two samples of Vienna Sausages found to be somewhat soft, the cans may have been hydrogen swells or the organisms have died during storage.

Table 2. The comparative Insterility of Commercial Samples.

Product Examined	Total No. of Cans	No. of Cans Sterile	No. of Cans Containing Microorganisms	Per Cent Infected	Obligate Anaerobes Recovered	Spore Forming Aerobes	Facultative thermophiles	Non-Spore Forming Bacilli	Micrococci
Tongue (6 lb. cans)	31	28	3	9.7	0	3	0	1	1
Tongue (6—20 oz. cans)	54	52	2	3.7	0	2	1	1	1
Deviled Tongue .	12	12	0	0	0	0	0	0	0
Sausage	24	19	5	20.8	1	4	0	2	4
Vienna Sausage. .	84	79	5	5.9	0	2	0	1	3
Liver Hash . . .	6	5	1	16.7	0	0	0	0	1
Corned Beef Hash	61	59	2	3.3	0	2	0	0	0
Roast Beef . . .	25	24	1	4.0	0	0	0	0	1
Corned Beef . . .	6	6	0	0	0	0	0	0	0
Potted Meat . . .	125	118	7	5.6	1	2	0	1	4
Chili-con-carne . .	24	23	1	4.2	0	0	0	1	0
Tripe	30	28	2	6.7	0	1	0	1	0
Boned Chicken . .	24	24	0	0	0	0	0	0	0
Chicken-a-la-King.	12	12	0	0	0	0	0	0	0
Brain	24	24	0	0	0	0	0	0	0
Meat and Vegetable Stew	11	10	1	9.1	0	1	0	0	0
Chicken Soup . .	6	5	1	16.7	0	0	0	1	0
Total for above .	559	528	31	5.5	2	17	1	9	15
Spiced Ham . . .	19	0	19	100.0	19	8	4	3	5

Jensen, Wood and Jansen (1934) (17) have recently shown that swelling of spiced ham is due to presence of aerobic, spore-forming bacteria which are able to form carbon-dioxide in the canned meat product. The organisms were said to be quite like Bacillus subtilis, and were said to be present in large numbers in the spices added to the meat and on the paper used for wrapping it. Thus the product may be seeded with "spoilage organisms" even though the raw materials are free of them.

Table 3. The Comparative Insterility of Suspected Samples.

Product	Total No. of Cans	No. of Cans Sterile	No. of Cans Containing Microorganisms	Per Cent Infected	Obligate Anaerobes Recovered	Spore Forming Aerobes	Facultative Thermophiles	Non-spore Forming Bacilli	Micrococci
Spiced Ham . . .	24	2	22	91.7	12	8	2	2	12
Corned Beef . . .	4	0	4	100.0	0	3	2	1	0
Corned Beef Hash	2	0	2	100.0	0	1	0	0	1
Roast Beef . . .	3	2	1	33.3	0	1	0	0	0
Chicken-a-la-king .	1	0	1	100.0	1	1	0	0	0
Lamb Stew . . .	1	0	1	100.0	0	1	0	0	0
Sausage	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Vienna Sausage .	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Tripe	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Brain	2	2	0	0	0	0	0	0	0
Total	43	12	31	72.1	13	15	4	3	13

Moran (18) has recently stressed the need of strict sanitation in the preparation of canned meat products which are not cooked under steam pressure. He found that when the number of bacteria in the raw product exceeded 100,000 per gram, there was danger of spoilage. Introduction of galvanized table tops and equipment was one part of the control program. Raw materials with a low number of bacteria yielded products with better keeping quality.

The possibility of microorganisms developing upon storage led to the division of the samples studied in this investigation into two groups. Although an increase in the incidence of infection might be expected upon storage, 27 (7.1%) of 379 cans opened immediately were positive while only 4 (2%) of the 199 held 3 to 6 months were found to contain viable bacteria. It is unfortunate that the date all samples were packed could not be determined since the low percent of infected cans found in both groups may actually be due to a loss of viability upon storage.

The results of this study indicate that process times and temperatures with the highest sterilizing value yield products which exhibit higher incidence of sterility. Such a situation would be expected. Products such as lunch tongue, Ox tongue, and deviled tongue are given a low process and show accordingly, higher incidence of viable organisms. On the other hand, products given heavier processes are uniformly free from viable microorganisms. Comparison of sterilizing values of the various processes with the results of bacteriological examination show this.

Organisms Isolated.

The bacteria which were isolated from canned meat products used in this investigation may be arranged into four groups as were those reported by Savage, Hunwicke and Calder (9), as follows: 1. Obligate anaerobes, 2. Spore-forming aerobes, 3. Thermophilic bacteria, 4. Micrococci.

Obligate Anaerobic Bacteria. — Strictly anaerobic bacteria were isolated twice from cans of sausage and potted meat and nineteen times from "spiced-ham". The latter product is cured before canning,

and is, therefore, not given a heavy process. While anaerobic spore forming bacteria are important they are apparently uncommon in merchantable canned meats. Those which were isolated from the canned meat products used in this investigation were definitely putrefactive in culture media. None of the cultures were poisonous to guinea pigs by mouth indicating that Clostridium botulinum was probably not present, or if it were present it had not formed toxin. The following species were identified according to the key suggested by Hall (14). Bacillus sporogenes, Bacillus putrificus, Bacillus putrefaciens, Bacillus multifermentans and Bacillus tetanomorphus.

Spore-Forming Aerobes: Members of this group were more common than members of any other group although micrococci were a close second. Canned tongue, sausage and potted meat were especially significant in this respect. Spiced ham also harbored these organisms in both sound and unsound samples. Our work with these forms indicated that they are not important as spoilage organisms. They were isolated even from cans of spiced ham which had not exhibited signs of spoilage. This would indicate that more than the mere presence of these organisms in canned meat is necessary. Some special conditions or presence of certain other organisms may be required before they will produce spoilage. Members of this group are thus shown to be quite prevalent in certain canned meat products. These products are not necessarily harmful and are probably sound and suitable for consumption.

Thermophilic Bacteria: Members of this group were not common in the cans of meat which were used. The types which were isolated were facultative growing both at 37° C. and 55° C. With the exception of normal spiced ham, they were isolated only from suspected or sour samples of meat products. Earlier investigators of meat products did not search for these types and consequently little is known about their distribution in meat products. Savage, Hunwicke and Calder (9) found them in 27 percent of the "shop tins" which they examined and to a lesser extent in rejected samples. There is no evidence that thermophilic bacteria are spoilage organisms for meat products as they are for vegetables and fruits.

Micrococci: These organisms were found in several products as has been done by previous investigators. Savage and Hunwicke found them in 20.7 percent of meat samples which they examined; canned marine products harbored them to the extent of 25 percent. During the early part of their work Savage and Hunwicke believed the presence of micrococci indicated faulty cans but later concluded that they might survive processes which would seem to be sufficient to destroy them. They made the pertinent statement that the heat resistance of micrococci surrounded by meat and fish tissue is a very different thing from that exhibited in broth cultures. This statement might well be extended to various foods preserved by canning. There seems to be no doubt that members of the Family Coccaceae may survive processes which yield a "commercially sterile" product; there may be some arguments over the explanation of their survival.

Micrococci were found to be especially prevalent in this investigation in canned sausage and potted meat. Why this should be true is difficult to understand for these products may be given heavier processes than others.

They were also present in "spiced ham" a product which cannot be given a heavy process.

Some who are inexperienced in the examination of canned foods would say immediately that contamination of cultures occurred. They would have to admit then, that practically every worker who has examined canned meat products has worked with contaminated cultures for they have found cocci to be present in many cans of apparently sound meat products. The contamination argument may be disregarded. Too many carefully carried out investigations have shown them to be present. To point out, as was done earlier in this paper, that an investigator who reported cocci, used technic which would be considered to be unreliable today, does not invalidate the results of another whose technic was satisfactory. To argue also in support of the contamination explanation on the ground that a process was used which was greater than that required for destruction of the organisms shows unfamiliarity with the problems involved in meat canning. Various investigators have pointed out that great differences may exist between heat resistance in a culture tube in the laboratory and in the solid food product itself. Heat resistance of bacteria is usually determined in menstrua quite different from the meat itself. Commercial canned meat processes used today have been established through scientific studies which have considered heat penetration and have been selected to prevent spoilage.

Other factors may also explain survival of so-called non-heat-resistant bacteria. Very little is known about the life-cycle of microorganisms in canned foods. There may be other stages than spores which are more heat resistant. Furthermore, certain constituents of the meat such as fats may help microorganisms survive heating at rather high temperatures. The possible significance of oil in sterilization of meat products is shown in a recent publication by Lang and Dean (19). Longer times were required for destruction of spores of Clostridium botulinum in fish products packed in oil. Considerable irregularity was experienced in resistance to heat in such products as sardines in oil and tuna in either cotton-seed or olive oil. These irregularities were said to be due to differences in the rate of heat transference between oils and moisture alone, and a mixture of moisture and oil. The same conditions may exist in canned meat products which are rich in fat. Such fat would probably be liquid at process temperatures.

Another possibility is that the cocci which have been isolated are stages in the life cycle of an organism which may at other times appear as a rod. Some evidence was secured which suggested this.

The presence of viable microorganisms in canned food products is of minor significance. It is more important to determine whether the food is sound and wholesome as Esty (20) has recently pointed out. In a paper before the American Public Health Association he stated that soundness does not necessarily mean absolute sterility. The expression "commercially sterile" has been introduced to denote the condition of soundness even though dormant viable bacteria may be present. About the same position was reached by Savage, Hunwicke and Calder (9), after an exhaustive study of canned meat and marine products.

Microorganisms in canned foods such as those used in this investigation are of significance largely for two reasons: 1, their ability to cause spoilage and 2, their possible role in food poisoning. Results of this investigation

indicate that, as far as spoilage is concerned, most of the viable bacteria which were found are unimportant. No evidence was secured to indicate that any of the organisms isolated could produce symptoms of illness. While it is true that staphylococci in certain food products have recently been connected with food poisoning outbreaks no evidence is available that all species may function in this manner. Ability to cause food poisoning is not related to morphology and before a staphylococcus or any other bacterium may be incriminated in food poisoning, definite information indicating that fact must be established by acceptable bacteriological methods and logic.

Since botulism has been occasionally attributed to canned meat products, a number of specimens of uncured meat and cans of the finished product were examined for Clostridium botulinum. Botulism is apparently of little significance as far as canned meats are concerned. The experience of the industry has been remarkably free from food poisoning of this nature when the great amount of canned meat which has been distributed, is considered.

Ninety-three cans of meat products (18 whole ham, 57 spiced ham, 4 each of luncheon meat, tongue of two kinds, pork loin and 2 of liver loaf) were opened aseptically and sampled according to technic described earlier in this paper. All such products are given a low process and stored under refrigeration. After incubation for 10 days at 37° C., one cubic centimeter of the unheated culture was fed to a guinea pig. No symptoms developed indicating the absence of Clostridium botulinum spores or their inability to develop and form toxin.

Another set of samples consisted of 238 one and one half pound cans of raw pork trimmings collected to show the presence or absence of spores of Clostridium botulinum. Since in other work in the laboratory inhibition of Clostridium botulinum by other bacteria in meat had been observed, 60 of the cans were processed after closing at 73.9° C. (165° F.) for 140 minutes. The uncooked samples were iced and delivered immediately to the laboratory. On account of the danger of overlooking a few spores, the entire contents of these cans were placed in liter flasks containing sufficient sterile broth to cover the meat. The meat cultures were incubated at 37° C. for 10 days. Toxin could not be demonstrated. These results indicate either the entire absence of spores of Clostridium botulinum in the raw materials or their inability to grow.

The inhibiting effect of Clostridium sporogenes on the production of toxin by Clostridium botulinum as reported by Jordan and Dack (21) might explain the negative results found in the case of uncured and unprocessed samples. With this in mind an inoculated pack was prepared and cultured. One pound of finely ground meat was thoroughly mixed with a detoxified suspension of Clostridium botulinum in a sterilized mortar and pestle. This mass of meat was used as inoculum and divided into portions approximately representing the number of cans to be filled. A small piece of inoculated meat was placed in the center of a divided portion of meat. These representative divisions were then placed in the mixer and thoroughly mixed for ten minutes. It is believed that by using this technic the spores were about as well distributed throughout the meat as possible. The 404×307 cans were then filled with 1¼ pounds of meat, closed, and tipped under 25—27 inches of vacuum. Arbitrarily a concentration of 10 to 12 spores per can was attempted since

it was assumed that this small number of spores would approximate the load of orgainsms which might be encountered in commercial products.

Fifty-six samples described above were canned on six different occasions and cultured immediately upon arrival at the laboratory. The entire contents of each container was cultured and incubated. Twenty additional inoculated samples processed for 140 minutes at 73.9° C. (165° F.) were also examined.

Sufficient toxin to kill guinea pigs was formed in only two of 56 unprocessed samples. This indicates probably that other bacteria in the meat prevented either the development of the spores or destroyed the toxin after it was formed. On the other hand, sufficient toxin to kill guinea pigs was found in 17 of 20 processed samples. Processing apparently so reduces the bacterial population that the field is left free for Clostridium botulinum.

Results reported in this paper indicate that a distinction should be made between "commercial sterility" and "cultural or laboratory sterility". Attempts to establish the latter give any viable spores which may be present every opportunity to develop; investigations of "commercial sterility" attempt to determine whether any viable bacteria which may have survived the process in the can, are able to grow under the conditions which obtain in the can. It is not always easy to establish "commercial sterility" of a pack as has recently been pointed out by Esty (20).

Conclusions.

Canned meat products occasionally contain viable microorganisms. The percentage of cans with such organisms as revealed by this investigation is 5.5 for products other than spiced ham. The latter product, processed at temperatures below 100° C. (212° F.), would be expected to carry viable bacteria.

Spoilage of underprocessed meat products, including whole and spiced ham, may be prevented only by adequate refrigeration.

The presence of viable bacteria in a few normal cans would place canned meat products in the same category as canned vegetables. Viable bacteria are frequently dormant and may eventually succumb on storage. In a few cases, they develop to spoil the product.

Ninety-three commercially canned meat products, chiefly whole and spiced ham, and 238 samples of uncured meat, 60 of which were processed, failed to show any evidences of the presence of spores of Clostridium botulinum.

Two of 56 unprocessed and 17 of 20 processed inoculated samples developed toxin producing symptoms typical of botulism in guinea pigs. These results support the opinion that the presence of other organisms may inhibit the formation of toxin by Clostridium botulinum.

Bibliography.

(1) Vaillard, L., Les conserves de la viande. (Rev. d'Hyg. Vol. 24. 1902. p. 27.) — (2) Deichstetter, J., Über den Keimgehalt der Fleischkonserven. (Ztschr. f. Unters. d. Nahrg.- u. Genußmittel. Bd. 4. 1901. S. 1115.) — (3) Pfuhl, E., Beitrag zur bakteriologischen Untersuchung der Fleischkonserven. (Ztschr. f. Hyg. Bd. 48. 1904. S. 121—134.) — (4) Cathcart, E. P., The Bacterial flora of blown tins of preserved foods. (Journ. of Hyg. Vol. 6. 1906. p. 248—250.) — (5) McBryde, C. N., A study of the methods of canning meats with reference to the pro-

per disposal of defective cans. (Twenty-fourth Ann. Rep. L. A. I., 279. 1907.) — (6) Fowler, Third Rep. Com. on Physiological Effects of Food, Training and Clothing on the Soldier. Quoted from Weinzierl. — (7) Weinzirl, John., The bacteriology of canned foods. (Journ. Med. Res. Vol. 39. 1919. p. 349—413.) — (8) Cheyney, E. W., A study of the microbes found in merchantable canned foods. (Journ. of Med. Res. Vol. 40. 1919. p. 177—197.) — (9) Savage, William G., Hunwicke, R. F., and Calder, R. B., The bacteriology of canned meat and fish. Food Investigation Board, Report No. 11. 1922. — (10) Bidault, Sur le bombement d'origine microbienne des beites de conserves. (Soc. scient. Hyg. Alimentaire. T. 12. 1924. p. 315—340.) — (11) Forgeot, P., and Goldie, N., Sort des microbes dans les conserves de viande. (Rev. Hyg. Med. Prevent. T. 54. 1932. p. 253—270.) — (12) Walsh, L. Crosbie, Bacteriology in the Canning Factory. (Food Manufacture. Vol. 7. 1932. p. 107.) — (13) Thornton, Douglas, Tinned Foods. (Brit. Food Journ. Vol. 35. 1933. p. 25.) — (14) Tanner, F. W., The Microbiology of Foods. Twin City Publishing Co., Publishers, Champaign, Ill. 1932. — (15) Tanner, F. W., and Evans, Florence L., Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria. I. Sodium Chloride. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 88. 1933. S. 44—53.) — Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria. II. Sodium Nitrate. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 89. 1933. S. 48—54.) — Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria. III. Sodium Nitrite. (Zentralbl. f. Bakt., Abt. II. Bd. 91. 1934.) — Evans, Florence L., and Tanner, F. W., In press. The Effect of Meat Curing Solutions on Anaerobic Bacteria. IV. The Effect of Mixed Curing Solutions. (Zentralbl. f. Bakt.) — (16) Stickel, J. E., and Meyer, K. P., Peptic and Tryptic Digestion Products as Inexpensive Culture Medium for Routine Bacteriological Work. (J. Inf. Dis. Vol. 23. 1918. p. 68—81.) — (17) Jensen, L. B., Wood, L. H., and Jansen, C. E., Swelling in Chopped Canned Hams. (Ind. and Eng. Chem. Vol. 26. 1934. p. 1118—1120.) — (18) Moran, J. A., Problems Arising in the Bacteriology of Canning Meats. The Canner. Nov. Vol. 3. 1934.) — (19) Lang, O. W., and Dean, S. J., Heat Resistance of Clostridium botulinum In Canned Sea Foods. (J. Inf. Dis. Vol. 55. 1924. p. 39—59.) — (20) Esty, J. R., Control of the Processing of Canned Foods In California. (Amer. Journ. Pub. Health.) — (21) Jordan, E. O., and Dack, G. M., The Effect of Clostridium sporogenes on Clostridium botulinum. (J. Inf. Dis. Vol. 35. 1924. p. 576—580.)

Nachdruck verboten.

Über Hypomyces rosellus (Alb. et Schw.) Tul.

[Aus dem Institut für Botanik und technische Mykologie der Forstlichen Hochschule Hann.-Münden.]

Von **H. Zycha.**

Mit 7 Abbildungen im Text.

Im Herbst 1931 wurde in der Nähe von Münden auf mit Moos bewachsener Rinde eines morschen Baumstammes ein schön himbeerrot gefärbtes, dichtes Perithezienlager eines Pyrenomyzeten gefunden, dessen Bestimmung als Hypomyces rosellus Herr Rektor Kirschstein-Berlin-Pankow in liebenswürdiger Weise nachprüfte und bestätigte.

Auf Malzagar gelang es leicht, die Askosporen zur Keimung zu bringen, einen dichten Myzelwuchs zu erzielen und Verunreinigungen auszuschalten. Während jedoch auf der ersten Kulturplatte noch reichlich Perithezien gebildet wurden, nahm deren Zahl auf den folgenden Überimpfungen — wie es ja auch in der Literatur mehrmals bei anderen Arten erwähnt wird — so stark ab, daß nach wenigen Passagen keine Perithezien mehr beobachtet werden konnten. Es lag nahe, zunächst den Einfluß der andersartigen Er-

nährung hierfür verantwortlich zu machen. da ja bei vielen Pilzen bekannt ist, in welch hohem Maße die Ausbildung der Fruchtkörper von einer geeigneten Ernährung abhängt. Der Pilz wurde deshalb auf verschiedenste Nährböden, wie Brot, Holz, Erde, sowie Möhren- und Kartoffel-Agar sauerer oder neutraler Reaktion ausgesät. Ebenso wurden auch synthetische Nährböden mit einer größeren Reihe unterschiedlicher Kohlenstoff- und Stickstoffquellen herangezogen, selbst unter Zusatz gewisser „Biokatalysatoren". Als alle diese Versuche den Pilz nicht veranlaßten Perithezien zu bilden, mußte angenommen werden, daß durch die künstliche Züchtung Einspor-(Klon-)Kulturen erzogen wurden, die erst nach Zusammenimpfung mit einem geeigneten Partner anderen Geschlechts zur Fruchtkörperbildung schreiten.

Nach langem Suchen konnte im Herbst 1934 an anderer Stelle in der Umgebung von Münden auf einem Boletus-Fruchtkörper ein konidientragender Pilz gefunden werden, der große Ähnlichkeit mit dem bei mir in Kultur befindlichen Hypomyces zeigte, aber ebenfalls keine Perithezien bildete. Schon der erste Versuch, die beiden Pilze gegeneinander zu impfen, ergab nach etwa 4 Wochen eine große Zahl typischer Fruchtkörper, so daß damit zum mindesten der Zusammenhang zwischen der Konidienform und der Askusform von Hypomyces rosellus in einwandfreier Weise nachgewiesen werden konnte.

Da ich vorläufig keine Gelegenheit habe, die sich aufdrängenden Fragen nach dem sexuellen Verhalten von Hypomyces rosellus, nach der Art der Perithezien- und Askusbildung usw. zu bearbeiten, soll hier zunächst nur eine genaue Beschreibung des Pilzes gegeben und seine systematische Stellung kurz erörtert werden.

Beschreibung des Pilzes.

a) Vegetatives Myzel.

In Reinkultur auf Malzagar breitet sich das Myzel schnell dicht aus und erreicht eine Höhe von etwa 5 mm. Das Wachstum ist so kräftig, daß gelegentlich auftretende Verunreinigungen, wie etwa Penicillium, die sich auf einer noch nicht vollständig bewachsenen Platte eingestellt haben, ohne weiteres überwuchert werden. Die Hyphen zeigen in regelmäßigen Abständen Querwände und bilden im Substrat zahlreiche Anastomosen. Das Luftmyzel erscheint durch einen in die Wand mehr oder weniger eingelagerten Farbstoff gelb. Das Substratmyzel selbst ist farblos, verleiht jedoch dem Nährboden — bei der meist auftretenden alkalischen Reaktion — eine tief dunkelrote Färbung. Mit Alkohol läßt sich der Farbstoff leicht in größerer Menge ausziehen und schlägt dann bei einem p_H von etwa 7,2 vom Gelb des saueren Bereiches ins Rot des alkalischen um. Auf „physiologisch saueren" synthetischen Nährböden wächst der Pilz auch im Substrat gelb; ebenso wenn etwa ein säurebildender Pilz (z. B. Penicillium) in der Nähe wächst. Das Myzel dringt nur wenige Millimeter tief in den Nährboden ein. In älteren Kulturen lassen sich gewisse abgegrenzte Hyphenpartien beobachten, welche mit kleinen Fettkügelchen gänzlich angefüllt sind.

b) Konidienbildung.

Während der mehrere Jahre in künstlicher Kultur gezüchtete Stamm 1 die anfangs sehr reichliche Konidienbildung inzwischen etwas verringert hat, zeigt der jüngere Stamm 2 noch sehr üppige Konidienbildung. Die Konidien

entstehen an verzweigten, mehr oder weniger niederliegenden Trägern von mehreren Millimeter Länge, welche dem Substratmyzel entspringen. Die Seitenäste zweigen meist gegenständig ab und tragen an der Spitze einen oder mehrere ziemlich dichtstehende Wirtel von drei Ästchen oder drei schwach flaschenförmigen Sterigmen (Abb. 1). Letztere tragen an der etwas knopfförmig ausgebildeten Spitze eine oder mehrere Konidien. Unter gewissen Bedingungen, sei es Trockenheit oder Nährstoffmangel, bleiben die Träger kleiner als 1 mm und bilden nur dichtstehende Quirle von Sterigmen, so daß der Fruchtstand dann köpfchenartig aussieht und große Ähnlichkeit mit der Gattung Mucrosporium Preuß aufweist. Bei besonders üppigem Wachstum können die Fruchtträger auch das Aussehen eines großen, lockeren Koremiums zeigen, da sie sich gerne büschelförmig aneinanderlegen.

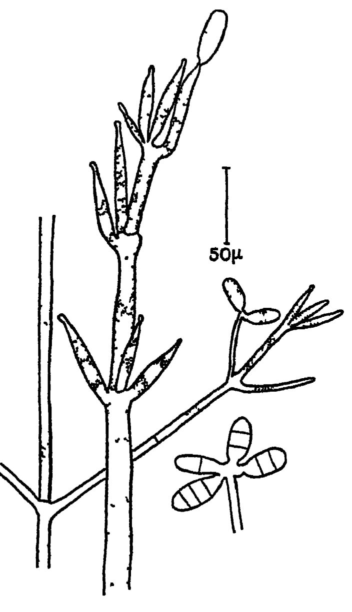


Abb. 1. Konidienträger mit Sterigmen und einzelnen Konidien.

Die Konidien haben zylindrische Form mit abgerundeten Enden und weisen an der Ansatzstelle einen kurzen Fortsatz auf. Oft hängen die Abkömmlinge einer Sterigme seitlich anastomosenartig zusammen, doch konnte eine kettenförmige Anordnung nie beobachtet werden. Gelegentlich kommt es vor, daß einzelne Konidien an der Spitze weiterwachsen, ohne daß die Verbindung mit der Sterigme gelöst wird. Die Enden solcher Hyphen können neue Konidien entstehen lassen, ohne daß besondere Sterigmen gebildet werden, was wohl als Übergang zu kettenförmiger Konidienbildung zu betrachten ist.

Die Größe der Konidien beträgt 6—9 × 20—30 μ, wobei sich Breite zu Länge stets wie 1 : 3—4 verhält. In der Regel zeigen sie drei Querwände, welche vier ziemlich gleiche Zellen abteilen (Abb. 2). Während mehr als drei Querwände nie beobachtet werden konnten, finden sich etwas kleinere, nur zweizellige Konidien nicht allzu selten. Normalerweise sind die Konidien farblos (weiß). In älteren Kulturen werden immer einzelne Formen beobachtet, die sich mit einer dickeren Wand umgeben, wobei sich die einzelnen Zellen etwas abrunden und an den Querwandstellen eine geringe Einschnürung entsteht (Abb. 2, rechts). Das Aussehen solcher Konidien erinnert an Gemmen; offenbar sind sie als Übergangsformen zu betrachten.

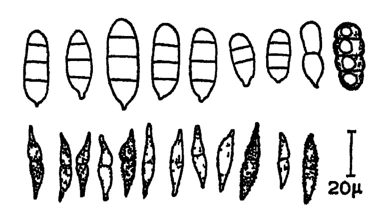


Abb. 2. Verschiedene Formen von Konidien (oben); (unten) Askosporen.

c) Gemmenbildung.

Neben den Konidien treten auch Gemmen (Chlamydosporen) auf, die an der Oberfläche des Substrates mehr oder weniger verborgen sind. Wie

Abbildung 3 zeigt, entstehen sie an den Enden normaler Hyphen, die keulenförmig anschwellen, in geringerem Abstande Querwände bilden und sich mit einer dicken Membran umgeben. Die Gemmenhyphen können weiterwachsen und sich verzweigen, so daß auffallend dichte, rote Knäuel zustande kommen, welche fast die Größe von Perithezien erreichen und bei oberflächlicher Betrachtung auch leicht mit diesen verwechselt werden. Die Gemmen haben einen plasma- und fettreichen Inhalt; ihre Wand ist nicht nur besonders dick, sondern zeigt vielfach auch eine eigenartige Skulpturierung. Die weitere Entwicklung der Gemmen konnte noch nicht beobachtet werden.

Außer den Anhäufungen von Gemmen lassen sich in Einsporkulturen gelegentlich auch sklerotienartige Zellanhäufungen von roter Farbe beobachten, die wohl als abortive Perithezien betrachtet werden können, da sie aus den gleichen Zellen bestehen wie diese, ohne jedoch birnförmige Gestalt anzunehmen oder Askus-Anlagen zu zeigen.

d) Perithezienbildung.

Abkömmlinge eines Klons bilden nach meinen Beobachtungen allein keine Perithezien. Werden auf einer Platte die von mir als Stamm 1 und 2 bezeichneten Pilze einander gegenüber ausgesät, so macht das Wachstum der beiden Pilze an der Berührungsstelle nicht halt, son-

100 µ

Abb. 3. Entstehung der Gemmen am Hyphenende.

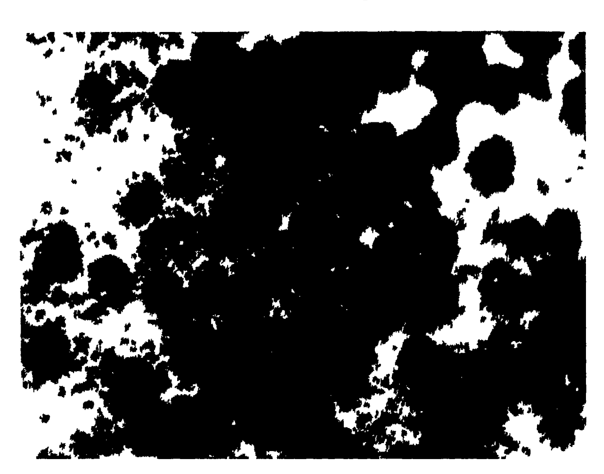


Abb. 4. Junge Perithezien.

dern beide Rasen greifen völlig ineinander über. Nach etwa drei Wochen lassen sich die ersten roten Perithezien-Anlagen beobachten[1]). Woran es liegt, daß diese stets nur auf der zunächst mit dem jüngeren Stamm 2 beimpften Schalenhälfte auftreten, ist mir nicht bekannt. Die heranreifenden Fruchtkörper erheben sich etwa zur Hälfte aus dem relativ lockeren, wolligen Hyphengeflecht und fallen zwischen dem gelben Luftmyzel durch ihre rote Färbung auf.

[1]) Sowohl Stamm 1 als auch Stamm 2 geben keine Perithezien, wenn sie etwa mit Diplocladium minus Bon. oder Dipl. majus Bon. zusammen geimpft werden.

Die jugendliche Kugelform (Abb. 4) wird birnformig, wenn die Aszi reif sind; die Spitze der Perithezien erscheint dann etwas heller und glatter (Abb. 5). Von einem „Stroma", auf oder in dem die Perithezien angelegt werden, kann kaum die Rede sein. Die Perithezien stehen meist dicht geschart, doch haufig auch einzeln. Ihre Große betragt etwa 320 × 500 μ. Die 4,5—5 × 125 μ großen Aszi enthalten 8 einreihig angeordnete Sporen (Abb. 7). Letztere werden bei der Reife — wie schon von Tulasne (1865) beschrieben — als weiße schleimige Masse aus dem Ostiolum langsam ausgepreßt. Diese Sporenmasse wird spater gelb und bleibt, falls sie nicht mit Wasser in Beruhrung kommt, lange auf der Mundung des Peritheziums erhalten (Abb. 6). Paraphysen sind nicht vorhanden.

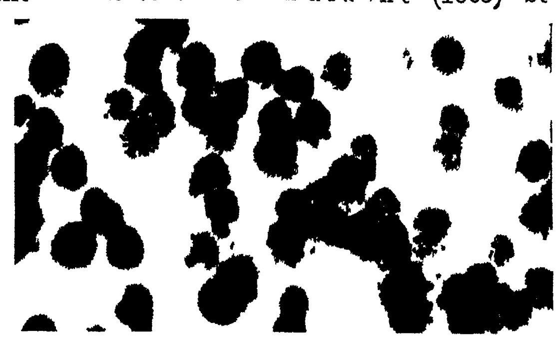


Abb 5 Fast reife Perithezien.

Die Askosporen (Abb. 2) zeigen die unten beschriebene typische Form und sind 5 × 24 μ groß.



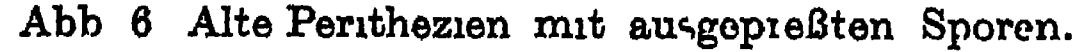


Abb 6 Alte Perithezien mit ausgepreßten Sporen.

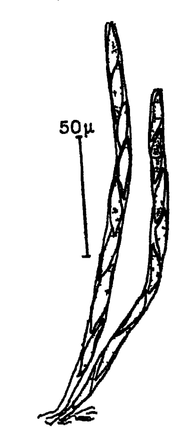


Abb 7 Reife Aszi.

II. Systematik.

Die systematische Einteilung der Hypocreales stoßt noch auf manche Schwierigkeiten, da viele Gattungen und Arten nur sehr unvollkommen bekannt sind. Eine Ordnung muß daher kunstlich erfolgen, und es laßt sich kaum vermeiden, einzelne einander offensichtlich sehr nahe stehende Gattungen auseinanderzureißen. Da die Ausbildung eines Stromas nicht regelmäßig genug erfolgt, um als primäres Ordnungsprinzip herangezogen zu werden, erscheint es zweckmäßig, mit Gäumann (1926) (im Anschluß an Saccardo und Moller) die Familien durch die Art der Askosporen zu kennzeichnen.

Uns interessieren hier nur die Gattungen mit zweizelligen Askosporen (Didymosporae). Von diesen wieder nur die gemmenbildenden Formen, die sich folgendermaßen unterscheiden lassen:

Askosporen beidendig schnabelförmig zugespitzt, Konidien — soweit bekannt — vom Verticillium-Diplocladium-Typus: Hypomyces (Fr.) Tul.

Askosporen nicht zugespitzt, Konidien Fusarium-artig: Nectriopsis Maire.

Eine Einteilung der Gattungen und Arten nach dem Substrat, wie sie etwa Seaver (1909) vornimmt, erscheint gänzlich verfehlt; schon deshalb, weil ja eine große Zahl von Arten sich rein saprophytisch ernährt. Ob die Gemmenbildung, welche Wollenweber (1913) als Gattungsmerkmal einführte, ein genügendes Unterscheidungsmerkmal ist, können erst weitere Beobachtungen ergeben. Arten wie Nectria cancri Rutg., N. haematococcus Berk. et Br. u. a. nur auf Grund der Beobachtung von Gemmen in die Gattung Hypomyces überzuführen (Wollenweber 1924, 1926), erscheint mir nicht angebracht. Vielmehr halte ich es dann schon für zweckmäßiger — und Wollenweber (1924) hat es schon erwogen —, die Gattung Nectriopsis Maire (1911) aufrechtzuerhalten und ihr die von Wollenweber dem Hypomyces-Subgenus Fusariomyces zugeteilten Arten unterzuordnen.

Nach diesen Gesichtspunkten eingeteilt, umfaßt die von Fries (1849) als Subgenus begründete Gattung Hypomyces (Fr.) Tul. nur Arten, die in einer Reihe von Merkmalen besonders gut übereinstimmen.

Die älteste systematische Bearbeitung der Gattung Hypomyces (im weiteren Sinne) verdanken wir Plowright (1882), nachdem zuvor Tulasne (1865) einige Arten eingehend beschrieben und abgebildet hatte. Eine weitere Zusammenfassung geben Ellis und Everhart (1892), Seaver (1909, 1910) und Maire (1911). Wollenweber (1913, 1924, 1926) geht leider nur auf wenige Arten ein.

Aus diesen Arbeiten und einigen zerstreuten Literatur-Angaben ergibt sich folgendes Bild der Gattung Hypomyces (im engeren Sinn):

Nach Maire (1911) lassen sich zwei Sektionen unterscheiden:

a) Askosporen durch die Querwand symmetrisch geteilt:
Sectio Isospori;

b) Askosporen durch die Querwand asymmetrisch geteilt:
Sectio Anisospori.

Da von den Anisospori bisher Konidienformen nicht bekannt geworden sind, sollen sich die folgenden Ausführungen vor allem auf die Sektion Isospori beziehen.

Perithezien selten einzeln, meist gehäuft auftretend, fleischig, von gelber, hellbrauner oder roter Farbe. Gestalt kugelig bis birnförmig, bis 0,5 mm hoch und in ein mehr oder weniger lockeres Hyphengeflecht eingebettet. Paraphysen fehlen, Aszi mit je 8 einreihig angeordneten Sporen, die bei der Reife als schleimige Massen durch das nur schwach ausgebildete Ostiolum ausgepreßt werden. Die spindelförmigen zweizelligen Sporen zeigen eine variable Einschnürung an der Stelle der Querwand; die beiden Spitzen sind schnabelförmig vorgezogen, die Membran erscheint deutlich punktiert, wenn die Sporen ausgereift sind. Die Merkmale der Sporen sind nicht immer augenfällig ausgebildet, was zu Verwechslungen Anlaß geben kann. So ist vor allem die Querwand oft erst nach Anfärbung zu erkennen, so daß es nicht erwiesen erscheint, ob das in der Literatur vielfach erwähnte Auftreten einzelner einzelliger Askosporen auch auf richtiger Beobachtung beruht. Dies ist von Bedeutung, weil von manchen Autoren die Gattung Pek-

kiella Saccardo (1891), welche sich von Hypomyces nur durch die einzelligen Askosporen unterscheiden soll, nicht anerkannt wird.

Die Bildung der Perithezien beschreiben Zukal (1885), Dangeard (1907) und Vincens (1917), doch ist über die Sexualität dieser Pilze noch nichts bekannt. Von den verschiedenen Beobachtern wird nur so viel berichtet, daß in künstlicher Kultur aus Konidien oder Askosporen — mit ganz wenigen Ausnahmen — keine Perithezien erhalten werden. Aus dem Verhalten der beiden von mir isolierten Hypomyces rosellus-Stämme, die bei gemeinsamem Wachstum Perithezien bilden, konnte man auf Diözie schließen. Kniep (1928) warnt vor voreiligen Schlüssen auf Diözie; ich möchte deshalb auch nicht meine Beobachtungen als unbedingt beweisend hierfür ansehen. Der negative Ausfall der Nährbodenversuche macht es jedoch sehr wahrscheinlich, daß wenigstens Hypomyces rosellus nicht monözisch ist.

Auch die Konidien und Gemmen zeigen — wenigstens soweit sie bisher bekannt sind — ziemlich einheitlichen Bau (s. u.).

Folgende Arten der Sectio Isospori sind in ihren Wuchsformen einigermaßen bekannt:

Askosporen 30—40 μ lang: 1. H. ochraceus (Pers.) Tul.
Askosporen 20—30 μ (höchstens vereinzelt 35 μ) lang:
Perithezien gelb: 2. H. aurantius (Pers.) Tul.
Perithezien rot: 3. H. rosellus (Alb. et Schw.) Tul.

Von den übrigen Arten sind nicht nur keine Konidien und Gemmen bekannt, sondern es sind auch die Perithezien nur ungenau beschrieben:

4. H. polyporinus Peck 1874 (Rep. 26. S. 84; Sacc. Syll. II. S. 474), Perithezien gelblich, Askosporen 4—4,5 × 15—20 μ.

5. H. tegillum Berk. et Curt. 1875 (Grevillea. 4. S. 15), Perithezien rotbraun, Askosporen 5—6 × 22—34 μ.

6. H. lactifluorum (Schw.) Tul. 1860 (Ann. Sc. Nat. Sér. 4. T. 13. p. 12), Perithezien anfangs orange, später hell-purpur; Askosporen 6—8 × 30—40 μ.

7. H. apiculatus (Peck) Seaver 1910 (Mycol. Vol. 2.[1] p. 73), Perithezien orange; Askosporen 7—8 × 25—35 μ.

8. H. javanicus v. Höhnel 1909 (Sitzber. K. Akad. Wiss. Wien. Bd. 118. S. 293), Askosporen 15—20 μ lang.

9. H. stereicola P. Hennings 1903 (Hedwigia. Bd. 42. S. 79), Perithezien gelb; Askosporen 1,5—2 × 4,5—5,5 μ.

1. H. ochraceus (Pers.) Tulasne 1865 (S. 61).

Sphaeria ochracea Persoon 1801 (S. 18).
H. armeniacus Tulasne 1860 (S. 12).
H. macrosporus Seaver 1910 (S. 81).

Abbildung bei Tulasne 1865, Lindau 1897, Seaver 1910, Maire 1911.

Perithezien ockerfarben, aus dem strohfarbigen Hyphenlager hervorbrechend. Askosporen 6 × 30 — 9 × 40 μ.

Meist auf Fruchtkörpern von Hutpilzen gefunden: Deutschland (Fuckel 1869); Frankreich (Tulasne 1860, 1865); Nordamerika (Ellis und Everhart 1892, Seaver 1910).

2. H. aurantius (Pers.) Tulasne 1865 (S. 43).
Sphaeria aurantia Persoon 1801 (S. 68).
Sphaeria aurea Greville 1823 (Taf. 47).
(?) Nectria Cesatii Montagne 1857 (S. 308).

Abbildung bei Tulasne 1865, Seaver 1910, Maire 1911, Vincens 1917, Wollenweber 1926.

Perithezien hell orangefarben, nach Wollenweber (1924) 220—350 × 280—400 μ. Aszi etwa 6 × 110—140 μ. Askosporen 5—6 × 15—24 μ. Eine genauere Beschreibung und Abbildung des Pilzes verdanken wir Vincens (1917).

Gefunden in Schweden (Fries 1822), Frankreich (Costantin 1894, Vincens 1917), Nordamerika (Fries 1822, Ellis und Everhart 1892, Seaver 1910).

3. H. rosellus (Alb. et Schw.) Tulasne 1865 (S. 45).
Sphaeria rosella Albertini et Schweinitz 1805 (S. 35).
Nectria rosella Fries 1846 (S. 388).
(?) Sphaeria rosea Persoon 1801 (S. 18).
Nectria Albertini Berkeley 1861 (S. 971).

Abbildung bei Albertini und Schweinitz 1805, Currey 1859, Berkeley und Broome 1861, Tulasne 1865, Plowright 1882, Lindau 1897, Seaver 1910, Maire 1911, Wollenweber 1924, 1926. — Abb. 1—7.

Perithezien blutrot und nach Wollenweber (1926) im Mittel 270 × 330 μ groß, dunkler als das zunächst gelbliche, wollige Hyphenlager. Aszi 6—7 × 120—150 μ. Askosporen 5 × 20—30 μ.

Sphaeria rosea Pers. soll sich vor allem durch etwas größere Askosporen (bis 37 μ lang) auszeichnen. Die Art wurde bereits von Tulasne verworfen, doch von Fuckel (1869), der den Pilz im Rheinland gefunden haben will, als Hypomyces roseus wieder zur Geltung gebracht. Meines Erachtens hat diesem Autor entweder eine etwas großsporige Variante vorgelegen oder aber H. ochraceus, der gelegentlich auch eine etwas rötliche Färbung annehmen soll.

Gefunden in Deutschland (Albertini und Schweinitz 1805, Fuckel 1869, Zycha s. oben), Frankreich (Tulasne 1865), England (Berkeley und Broome 1861, Plowright 1882), Schweden (Fries 1822), Nordamerika (Fries 1822, Ellis und Everhart 1892, Seaver 1910, Wollenweber n. pers. Mitt.).

Konidienformen.

Die Konidienpilze der drei genannten Arten sind einander sehr ähnlich[1]). Der Rasen ist weiß, gelblich oder schwach rötlich, relativ locker und bei geeigneten Ernährungs- und Feuchtigkeitsverhältnissen weit ausgebreitet. Die Hyphen zeigen in regelmäßigen Abständen Querwände und bilden gerne Anastomosen. Die Konidienträger können mehrere Millimeter lang werden und sind verzweigt. Die Seitenäste stehen in meist nur 2—3gliedrigen Wirteln. Die letzten Wirteläste werden zu den nur schwach flaschenförmig erweiterten Sterigmen, die an einer knopfförmigen Spitze eine oder mehrere eiförmige bis zylindrische Konidien tragen.

Die Konidien können ein- oder mehrzellig sein. Hierin liegt ein wesentliches Unterscheidungsmerkmal der drei Pilze; wobei allerdings betont wer-

[1]) Trotz dieser Übereinstimmung erscheint es noch verfrüht, von einem bekannten Konidienpilz (Diplocladium) auf einen hypothetischen Hypomyces zu schließen (Hypomyces Morchellae Costantin 1894).

den muß, daß stets ein gewisser Prozentsatz von Konidien in diesem Merkmal variiert. Ob die Querwandbildung mit Ernährungsfaktoren zusammenhängt, konnte noch nicht untersucht werden.

1a. Verticillium agaricinum Corda (im Sinne von Tulasne 1865) gehört zu H. ochraceus. Konidien eiförmig, einzellig, 10—13 μ breit, 10—20 μ, seltener 30—40 μ lang. Nach Lindau (1907) stimmt der von Tulasne und Plowright gekennzeichnete Pilz nicht mit der Diagnose Cordas überein. Genaueres können erst weitere Funde ergeben.

2a. Diplocladium minus Bonorden 1851 (S. 98).
(?) Didymocladium ternatum (Bon.) Saccardo 1886 (Syll. IV. S. 187).
Die Zugehörigkeit zu H. aurantius wird bereits von Fuckel (1869) angegeben und konnte von Vincens (1917) sowie von Wollenweber (nach freundlicher brieflicher Mitteilung) bewiesen werden. Konidien zweizellig, in der Mitte mehr oder weniger eingeschnürt, oval bis zylindrisch, 5—7 × 10—15 μ.
Der von Wollenweber aus Askosporen gezogene Pilz bildet die Konidien in kettenförmiger Anordnung, was jedoch von Vincens (1917) nicht angegeben wird. Wollenwebers Pilz müßte daher genauer als Didymocladium ternatum (Bon.) Sacc. bezeichnet werden. Vielleicht ist die Kettenbildung nur Rasseneigentümlichkeit. Jedenfalls ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß die beiden Pilze identisch sind.
Fundorte siehe bei Lindau (1907).

3a. Dactylium dendroides (Bull.) Fries 1832 (S. 414).
Mucor dendroides Bull. 1793 (S. 105).
Trichothecium candidum Bonorden 1851 (S. 99).
Trichothecium agaricinum Bonorden 1851 (S. 99).
(?) Diplocladium elegans Bainier et Sartory 1913 (S. 359).
Abbildung bei Bonorden 1851, Massee 1892, Tulasne 1865, Plowright 1882, Lindau 1897, 1907.
Die oben bewiesene Zugehörigkeit des Pilzes zu H. rosellus wurde bereits von Tulasne (1865) angegeben.
Konidien abgerundet zylindrisch, vierzellig, 9—13 × 26—35 μ.
Auf faulenden Hutpilzen u. dgl. in Europa und Nordamerika nicht selten gefunden.

Gemmenbildung.

Auf die dritte Art der Fortpflanzungszellen, die Gemmen (Chlamydosporen) der Hypomyces-Arten weist zuerst Tulasne (1865) hin, der die Gemmen bei H. ochraceus und H. rosellus beobachtete. Seitdem wurden die Gemmen, denen Wollenweber einen gewissen systematischen Wert beilegt, nur noch von Plowright (1882), Costantin (1894) und Vincens (1917) kurz erwähnt.

Die vorliegenden wenigen Abbildungen genügen jedoch bereits, um zu erkennen, daß die Form dieser Zellen und die Art ihrer Entstehung bei den drei uns hier interessierenden Hypomyces-Arten fast völlig übereinstimmt. Die Entwicklung geht so vor sich, daß das Ende einer Hyphe im Substrat oder an dessen Oberfläche keulenförmig anschwillt und sich in mehrere Zellen

teilt. Die fertigen Gemmen sind durch ihre verdickten Zellwände und die angehäuften Reservestoffe gekennzeichnet. Sie erscheinen gelblich oder rot und zeigen außen eine starke Punktierung oder Skulpturierung; Größe etwa 20—30 μ. Da die erwähnten Hyphenenden auch Verzweigungen aufweisen können, die sich ebenfalls in Gemmen verwandeln, werden oft ganze Konglomerate von Gemmen beobachtet. Diese dürfen weder mit jungen Perithezien verwechselt werden noch mit den in Einsporkulturen gelegentlich auftretenden sklerotienartigen Gebilden, die wahrscheinlich abortive Perithezien darstellen.

Über die besondere Funktion der Gemmen sowie über ihre Keimung ist noch nichts Näheres bekannt.

Einzelne Gemmenformen wurden wahrscheinlich auch als selbständige Pilze beschrieben. Plowright (1882) glaubt hier den Anschluß an die Gattung Blastotrichum Corda gefunden zu haben.

Zusammenfassung.

1. Der in Reinkultur gezogene Pilz Hypomyces rosellus (Alb. et Schw.) Tul. wird mit seiner Konidien-, Gemmen- und Perithezienform beschrieben.

2. Es wird wahrscheinlich gemacht, daß H. rosellus diözisch ist.

3. Die systematische Stellung des Pilzes wird erörtert und die Gattung Hypomyces scharf abgegrenzt.

Literaturverzeichnis.

Albertini, J. von und Schweinitz, L. D. von, Conspectus fungorum Lusatiae superioris. Leipzig 1805. — Bainier, G. und Sartory, A., Etude morphologique et biologique d'un Diplocladium nouveau à pigment, Diplocladium elegans n. sp. (Ann. Mycol. T. 11. 1913. p. 359—363.) — Berkeley und Broome, British fungi. (Ann. Mag. Nat. Hist. ser. 3. Vol. 7. 1861.) — Bonorden, Handb. d. allgem. Mykologie. 1851. — Costantin, J., Recherches sur un Diplocladium. (Bull. Soc. Bot. Fr. 291. 1888.) — Costantin, J., Sur la culture du Polyporus squamosus et sur son Hypomyces. (Bull. Soc. Mycol. Fr. T. 10. 1894. p. 102—106.) — Currey, Trans. Linn. Soc. Vol. 22. 1859. — Dangeard, P. A., L'origine du périthèce chez les ascomycètes. (Le Botaniste. T. 10. 1907. p. 1—385.) — Ellis, J. B. und Everhart, B. M., The North American Pyrenomycetes. (Newfield, N. Jers., 1892. p. 1—793.) — Fries, E. M., Systema Mycologicum II. Lund 1822. — Fries, E. M., Systema Mycologicum III. Lund 1832. — Fries, E. M., Summa Vegetabilium Scandinaviae . . . (Holmiae, Bonnier, 1846—49. p. 1—572.) — Fuckel, L., Symbolae mycologicae. (Beiträge zur Kenntnis der Rheinischen Pilze.) (Jahrb. Nassauisch. Ver. f. Naturkde. Bd. 23. 1869. S. 1—459.) — Gäumann, E., Vergleichende Morphologie der Pilze. Jena 1926. — Greville, Scottish Cryptogamic Flora. Vol. 1. Edinburg 1823. — Hennings, P., Fungi australienses. (Hedwigia. Bd. 42. 1903. S. 73—88.) — Kniep, H., Die Sexualität der niederen Pflanzen. Jena 1928. — Lindau, G., Hypocreales. (Engler-Prantl. Nat. Pfl.-Fam. Bd. I. 1. 1897. S. 343—372.) — Lindau, G., Hyphomycetes. (Rabenh. Krypt.-Fl. 1907.) — Maire, R., Remarques sur quelques Hypocréacées. (Ann. Mycol. T. 9. 1911. p. 315—325.) — Massee, G., British Fungus-Flora. 1892—95. — Montagne, Plantes cellulaires nouvelles. (Ann. Sc. Nat., 4. sér. Vol. 8. 1857. p. 285—310.) — Persoon, Chr. H., Synopsis methodica fungorum. Göttingen 1801. — Plowright, A monograph of the British Hypomyces. (Grevillea. Vol. 11. 1882. p. 1—8, 41—51.) — Seaver, F. J., The Hypocreales of North America. (Mycologia. Vol. 1. 1909. p. 41—76, 177—207.) — Seaver, F. J., The Hypocreales of North America. (Mycologia. Vol. 2. 1910. p. 48—92.) — Tulasne, L. R., De quelques Sphéries Fongicoles. (Ann. Sc. Nat.

4. sér. T. 13. 1860. p. 1—19.) — Tulasne, L. R. et C., Selecta fungorum carpologia. Bd. 3. Paris 1865. — Vincens, F., Recherches organogéniques sur quelques Hypocréales. (Thèses, Paris 1917. p. 1—166.) — Wollenweber, H. W., Studies on the Fusarium problem. (Phytopath. Vol. 3. 1913. p. 24.) — Wollenweber, H. W., Pyrenomyceten-Studien. (Angew. Bot. Bd. 6. 1924. S. 300—313.) — Wollenweber, H. W., Pyrenomyceten-Studien. II. (Angew. Bot. Bd. 8. 1926. S. 168—212.) — Zukal, H., Mykologische Untersuchungen. (Denkschr. Kais. Ak. Wiss. Wien, math.-naturw. Kl. Bd. 51. 1885. S. 21—36.)

Nachdruck verboten.

Eine Methode zur Feststellung des Befalls mit Fusicladium dendriticum vor dem Ausbruch der Schorfkrankheit bei Pirus malus.

[Aus der Prüfstelle für Pflanzenschutzmittel und Pflanzenschutzgeräte der Biologischen Reichsanstalt.]

Von **W. Holz.**

Mit 2 Abbildungen im Text.

Bei Untersuchungen über die Bedingungen für die Infektion mit Fusicladium dendriticum ist es wünschenswert, den Befall schon vor dem Durchbruch der Konidienrasen erkennen zu können; denn dieses Merkmal, das mit unbewaffnetem Auge festgestellt werden kann, tritt zu spät und vor allen Dingen sehr unregelmäßig auf. Vielfach breitet sich das Myzel unsichtbar sehr stark aus und wird erst spät durch die Bildung von Konidienrasen sichtbar, in anderen Fällen kommen die Konidien bereits nach geringem Myzelwachstum zum Durchbruch.

Babel versuchte, den Schorfbefall schon vor dem Ausbruch der Krankheit durch Infrarot-Aufnahmen sichtbar zu machen. Der Versuch mißlang. Ich selbst versuchte es zunächst durch Überführen der Apfelblätter in 90proz. Alkohol. Die Blätter hellten sich innerhalb von 24 Std. mit Ausnahme der vom Pilz befallenen Stellen vollkommen auf. Nur an den kranken Stellen blieb die grüne Farbe längere Zeit erhalten. Es war aber kein Pilzmyzel mikroskopisch zu erkennen. Auch die in Strasburgers Praktikum angeführten Färbemethoden (Anilinblau und Orselline BB oder Anilinblau und Vesuvin) gaben bei diesen in Alkohol aufgehellten Blättern keine Myzelfärbung des Fusicladiums. Ein Verfahren, welches die Infektion mit Fusicladium schon während der Inkubationszeit erkennen läßt, soll hier kurz beschrieben werden.

Die grünen Blätter werden bis zum Aufhellen, d. h. bis sie vollkommen durchsichtig sind, in 20proz. Kalilauge gekocht. Sie schrumpfen dabei auf ein Fünftel ihrer ursprünglichen Größe zusammen, so daß es nachher möglich ist, ein ganzes oder wenigstens ein halbes Blatt auf einen Objektträger zu bringen. Dadurch wird das Absuchen eines Blattes nach Pilzinfektionen wesentlich vereinfacht. Aus der Kalilauge bringt man das Blatt sofort in Essigsäure (96 proz.), in der es 5—10 Min. bleiben muß. Dann wird es vorsichtig auf einen Objektträger gebracht und unter einem leichten Wasser-

strahl geglättet, wobei die Essigsäure ausgespült wird. Nun gibt man unter schwachem Erwärmen des Objektträgers einige Tropfen einer stark verdünnten Gentianaviolettlösung (Stammlösung: Alkohol. gesättigte Gentianaviolettlösung von Schering - Kahlbaum [Katalog, 1934, Nr. 04478]; Gebrauchslösung: 0,5proz.) auf das Blatt, läßt sie einige Minuten einwirken und dann die überflüssige Farblösung abtropfen. Nachdem dies geschehen ist, fügt man einige Tropfen einer ebenfalls stark verdünnten Baumwollblaulösung (Stammlösung: nach Gage: 50 g Phenol, 50 g Milchsäure, 50 g Glyzerin, 100 g Aqua dest., 1 g Baumwollblau; Gebrauchslösung: 1 Teil Stammlösung auf 9 Teile Wasser) hinzu. Das überschüssige Baumwollblau darf nur einen Augenblick einwirken, da es sonst zu schnell das ganze Blatt blau färbt und die Färbung des Gentianavioletts überdeckt. Man muß es deshalb möglichst schnell abtropfen lassen. Weder das Baumwollblau noch das Gentianaviolett allein bewirkt eine Färbung des Pilzmyzels. Jede der beiden Farblösungen färbt allein nur die Nervatur des Blattes und das Myzel bleibt ungefärbt. Erst durch das Zusammenwirken

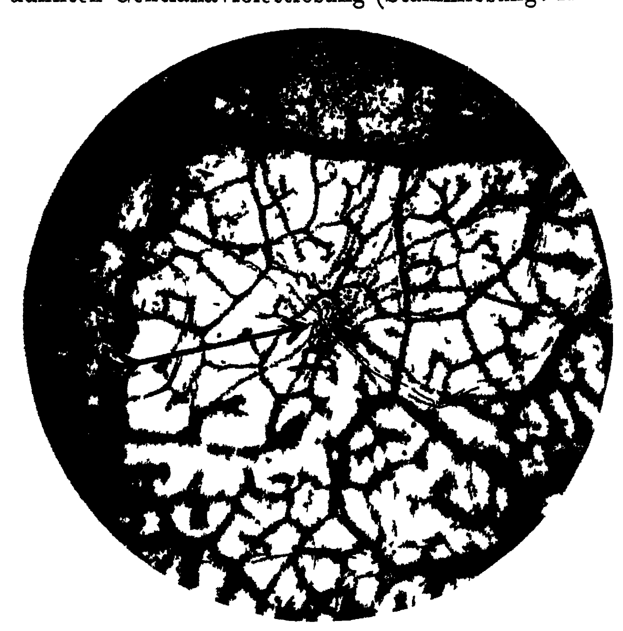


Abb. 1. Junges Myzel von Fusicladium dendr. vor dem Durchbruch der Konidien. Vergr. 103fach.



Abb. 2. Ausschnitt aus einem älteren Myzel von Fusicladium dendr. Vergr. 460fach.

der Farbstoffe ist eine Doppelfärbung zu erhalten, bei der das Pilzmyzel rotviolett und die Nervatur himmelblau gefärbt werden. In den beigefügten Abbildungen sind mikrophotographische Aufnahmen von Myzelsträngen des Fusicladiums in Apfelblättern wiedergegeben, die mit der beschriebenen Methode sichtbar gemacht wurden.

Diese neue Methode der Differentialfärbung hat für die Frühbestimmung von Fusicladiumflecken auf Apfelblättern noch den Vorzug, daß sie sehr einfach und schnell auszuführen ist; das ist bei der Untersuchung einer größeren Anzahl von Blättern besonders wichtig. Ob das Verfahren auch bei anderen Pilzen verwendet werden kann, müssen weitere Untersuchungen ergeben.

Literaturverzeichnis.

Babel, A., Infrarot-Photographie im Pflanzenschutz. (Angew. Bot. Bd. 17. 1935. S. 43—53.) — Gage, G. R., Studies of the life history of Ustilago avenae (Pers.) Jens. and of Ustilago levis (Kell. and Swing) Magn. (Cornell Univ. Agr. Exp. Sta. Memoir. Vol. 109. 1927. p. 1—35.) — Strasburger, E., Das Botanische Praktikum. 6. Aufl. 1921. S. 395.

Referate.

Morphologie, Physiologie und Systematik der Mikroorganismen; Virusuntersuchungen.

Koblmüller, L. O., Untersuchungen über Streptokokken. I. Mitteilung: Über bewegliche Streptokokken. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1935. S. 310—331.)

Das schon von Billroth behauptete Vorkommen eigenbeweglicher Streptokokken ist einwandfrei bewiesen und kann nicht mehr länger unberücksichtigt bleiben. Bisher sind 3 Stämme einwandfrei beweglicher Streptokokken beschrieben worden, Verf. fand allein 10. Sämtliche eingehend untersuchten Stämme standen den Milchsäurestreptokokken bzw. den Enterokokken so nahe, daß sie von diesen (abgesehen von der Begeißelung und der gelben Eigenfarbe mancher Stämme) praktisch nicht zu unterscheiden waren. Daß die Eigenbeweglichkeit mancher Streptokokkenstämme bisher so gut wie immer übersehen wurde, beruht offenbar auf mangelhaftem Vorgehen bei der Beweglichkeitsprüfung; es ist die starke Abhängigkeit der Bewegungsfähigkeit von der Züchtungstemperatur, vom Alter der Kultur, von der Besiedlungsdichte des Nährbodens, sowie von dessen Zusammensetzung und Reaktion zu berücksichtigen. Feste Nährböden sind flüssigen vorzuziehen. Zusätze von Kohlehydraten sind unnötig, von eiweißhaltigen Flüssigkeiten in größerer Menge (Serum, Ascites) sogar ausgesprochen schädlich, es sei denn, daß das Eiweiß durch Kochen verändert ist (auf Levinthalagar und Loefflerserum gute Beweglichkeit). Reaktion am günstigsten schwach sauer (p_H 6,8—6,6), Züchtung am besten bei Zimmertemperatur. In einzelnliegenden Kolonien erhält sich die Beweglichkeit erheblich länger als an dichtbewachsenen Stellen (hier oft nur wenige Stunden).

Als sehr zuverlässiges und einfaches Verfahren zur Beweglichkeitsprüfung wird die Methode nach Koblmüller und Vierthaler (Plattenmanipulator mit Mikronadel) empfohlen. Zur Vorprüfung fraglicher

Stämme eignet sich das Anlegen eines Stiches in niedrigprozentigem Agar (0,3% und weniger). Bewegliche Stämme rufen Trübung der Agargallerte bis zur Glaswand hervor (häufig unter Freibleiben bestimmter Zonen).

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Adam, D. B., and Pugsley, A. T., „Smooth Rough" variation in Phytomonas medicaginis phaseolicola Burkh. (Austral. Journ. Exper. Biol. Vol. 12. 1934. p. 193—202.)

Der Erreger der Fettfleckenkrankheit von Bohnen (Phaseolus vulgaris) wurde zuerst durch Burkholder (1926) bekannt und von ihm Phytomonas medicaginis var. phaseolicola genannt. Bei Frischisolierungen dieses Bakteriums durch die Verff. fanden diese, daß es S- und R-Formen bildete, ähnlich den wohlbekannten S- und R-Formen von Gram-negativen Organismen des Darmkanals. Eigenschaften der R-Form sind: fleckenförmiges Wachstum in Bouillon, relative Labilität in Natriumchlorid-Lösungen (höchstens bis zu 100° C), ebenso wie in Preßsaft von Bohnen, sich in 0,2 proz. Trypaflavinlösung agglutinierend. Die S-Form gibt dagegen gleichförmige (uniform) Trübung in Bouillon, ist allerdings stabil in Natriumchloridlösungen vor und nach der Erhitzung, und auch in Bohnenpreßsaft, und wird von 0,2 proz. Trypaflavinlösung nicht agglutiniert. Der S-Stamm zeigte sich empfindlich, der R-Stamm nicht, gegen einen Bakteriophagen, der aus erkrankten Bohnensamen gezüchtet war. Der R-Stamm besaß auch eine geringere Virulenz als der S-Stamm; Verff. entdeckten noch eine dritte Form, von ihnen „RV" genannt, die für die Bohnenpflanze nicht pathogen war. Durch die Agglutinationsprobe haben Verff. gezeigt, daß die Umwandlung S — R auch eine Veränderung des thermostabilen oder somatischen Antigens bewirkt.

Nicol (Rothamsted).

Voûte, A. D., Der Einfluß von Ageniaspis sp. auf ihren Wirt Phyllocnistis citrella Staint unter verschiedenen (mikro-) klimatischen Verhältnissen. (Arch. Néerland. de Zool. T. 1. 1935. p. 354—372.)

Verf. versucht den Beweis zu erbringen, die stärkere Parasitierung der Citrus-Minierraupe im Schatten beruhe darauf, daß bei höherer Feuchtigkeit die Blattcuticula zarter und vielleicht dünner sei als in der Sonne, so daß die Raupen in den Blättern von den Parasiten aufgefunden werden könnten, was bei kräftiger Cuticula nicht der Fall sei. Jedenfalls sei in entsprechenden Fällen auch auf die Beziehungen zwischen Parasit und Futterpflanze zu achten. — Die Untersuchung ist nicht völlig durchgeführt.

K. Friederichs.

Barsha, J., and Hibbert, Harold, Structure of the cellulose synthesized by the action of Acetobacter xylinus on fructose and glycerol. (Canad. Journ. Res. Vol. 10. 1934. p. 170—179.)

Die Häutchen, die durch die Tätigkeit von A. xylinus auf Fruktose- sowie auf Glyzerin-Nährlösungen gebildet wurden, sind nach geeigneter Reinigung nach den bekannten Methoden der Methylierung, Azetylierung usw. chemisch identisch mit Baumwolle-Zellulose. Dieses wurde auch bei der Röntgenanalyse bestätigt.

Durch Röntgenanalyse wurde auch die Identität der Zellulosemembranen, die durch A. xylinus aus Glykose, Saccharose, Galaktose und

Mannit gebildet waren, bestätigt. Verff. schließen daraus, daß, so oft Zellwandbildung, d. h. Wachstum vorkommt, auch das gleiche Polysaccharid gebildet wird, das tatsächlich identisch ist mit Baumwollzellulose.

N i c o l (Rothamsted).

Sniezko, St., Some Experiments on the Aerobic Cellulose Decomposing Bacteria. (A. Soc. Bot. Pol. Vol. 11. 1934. p. 51—84.) [Poln. m. engl. Zus.]

Verf. isolierte aus dem Schlamm des Mendota-Sees (bei Madison, Wis.) einige Zellulose zersetzende Bakterien von vibrionenähnlicher Gestalt. Die Zersetzung fand nur unter streng aeroben Bedingungen statt, Zugabe oxydierender Stoffe wirkte stimulierend auf die Zellulosezersetzung, reduzierende hemmten das Wachstum und auch die Zersetzung. Sie konnten auf einem Nährboden kultiviert werden, der aber nur optimal 0,7—0,8% Agar enthalten durfte, bei höheren Werten wurde die fein verteilte Zellulose nicht mehr angegriffen. Bakterienkolonien wurden nicht gebildet, die Zersetzer wuchsen nur auf den Fasern, denen die Bakterien folgten. Wurde statt der Zellulose Stärke gegeben, so bildeten die Bakterien Kolonien von gelblicher Farbe, die später ganz plötzlich innerhalb 10 Std. der Autolyse verfielen. Außer Zellulose wurden noch folgende Zucker angegriffen: Saccharose, Glukose, Galaktose, Maltose, Xylose, Laktose und Arabinose. Gegenüber Zellulose wurden diese Zucker von den Bakterien bevorzugt. Wurde dagegen Fruktose, Mannit oder Glyzerin beigegeben, so wurde die Zellulose in normaler Weise angegriffen. Unter den Zersetzungsprodukten fand Verf. Essigsäure, Buttersäure, Spuren von Milchsäure. S k a l l a u (Berlin).

Reploh, H., Vergleichende Untersuchungen an den langen Milchsäurebazillen der Vagina, des Säuglingsdarms und der Zahnkaries. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1935. S. 332—334.)

Da zwischen den verschiedenen Laktobazillen keine typischen Unterschiede nachgewiesen werden konnten, wird der schon früher von J ö t t e n und K r u s e vorgeschlagene gemeinsame Name „Bacillus lacticus" empfohlen. R o d e n k i r c h e n (Königsberg i. Pr.).

Lippelt, H. und Heller, C., Die Einwirkung der Kurzwellen auf Bakterien. (Klin. Wochenschr. Jahrg. 13. 1934. S. 1745—1749.)

Es wurde die Einwirkung von Kurzwellen zwischen 4 und 8 m Wellenlänge auf Kulturen von Pneumokokken, Staph. albus haemolyticus, Strept. haemolyticus und Bact. coli commune geprüft. Während Pneumokokken und Staph. albus haem. in ihrem Wachstum gehemmt wurden, trat bei Bact. coli bei kurzer Behandlungsdauer Förderung im Wachstum in Erscheinung. Bei langdauernder Behandlung blieb Coli unbeeinflußt, ebenso wie Strept. haem. in jedem Falle. Es wird danach unterschieden zwischen einer bionegativen und biopositiven Wirkung der Kurzwellen, die jedoch möglicherweise in verschieden starker Erwärmung der Bakterien ihre gleiche Ursache hat (die Nährböden erlitten durch die Kurzwellenbehandlung keine Veränderung, die das Wachstum von Bakterien beeinflussen konnte). Die durch die Kurzwellen geschädigten Bakterien zeigten, verglichen mit den durch Erwärmung im Wasserbad geschädigten Bakterien, ein abweichendes Wachstum nach dem Verimpfen in Bouillon. Dies erklärt sich daraus, daß im Wasserbad die Er-

wärmung durch die Zellmembran hindurch von außen erfolgt, im Kondensatorfeld dagegen von innen nach außen gerichtet ist. Außerdem besteht die Wahrscheinlichkeit, daß sich die im Wasserbad geschädigten Kulturen aus den in geringer Zahl vorhandenen wenig oder kaum geschädigten Individuen (wegen der Unmöglichkeit ganz gleichmäßiger Durchwärmung) in Bouillon voll regenerieren können, während die im Kurzwellenfeld geschädigten Bakterien alle annähernd gleich angegriffen werden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Jensen, H. L., Studies on saprophytic Mycobacteria and Corynebacteria. (Proc. Linn. Soc. New South Wales. Vol. 59. 1934. p. 19—61.)

Morphologische und biologische Beobachtungen über diese Bakterienarten, soweit sie im Erdboden vorkommen. Die Gattung Mycobacterium, relativ selten in der Erde, hat zwei Untergattungen, A und B: A, die echten Mycobakterien, mit Myc. tuberculosis als Typart, und B mit Myc. coeliacum als Typart. Die Arten A sind säurefest und wenig Säure produzierend; die Arten B sind nur schwach säurefest, haben eine größere Neigung zur Säureproduktion und eine charakteristische Cytomorphose, die sich in der Umwandlung von langen, oft zweigförmigen Stäbchen in Kokken zeigt. Die ganze Gattung steht den Proactinomyzeten nahe; die meisten Arten können Paraffin zersetzen.

Die Gattung Corynebacterium kommt oft in der Erde vor. Die saprophytischen Formen sind nicht säurefest, zersetzen nicht Paraffin, sind aber meist proteolytisch. Sie waren kaum von den gewöhnlichen parasitären Diphtheroiden zu trennen.

Viele schon geschilderte saprophytische Bakterien scheinen zu Mycobacterium: Untergattung B, oder zu Corynebacterium zu gehören. Verf. beschreibt drei neue Arten: Cor. tumescens, C. filamentosus und C. simplex. Es wurden Organismen gefunden, die einen natürlichen Übergang zwischen Corynebacterium-Arten und den nicht säurefesten, proteolytischen Proactinomyces bilden. Die Literatursammlung enthält ca. 160 Arbeiten. Nicol (Rothamsted).

Steinberg, R. A., The nutritional requirements of the fungus, Aspergillus niger. (Bull. of the Torrey Botan. Club. Vol. 62. 1935. p. 81—90.)

In Übereinstimmung mit den Feststellungen Bertrands und Javilliers hat Verf. bei der Fortsetzung seiner bekannten Untersuchungen über die für Aspergillus niger lebensnotwendigen Elemente nunmehr ebenfalls gefunden, daß neben Eisen, Zink und Kupfer auch Mangan für Wachstum und Sporenbildung unersetzbar notwendig ist. Unter Berücksichtigung der optimalen Mengen dieser 4 Schwermetalle ist es gelungen, eine Nährlösung aufzustellen, die höchste Ernten liefert und doch nur eine Gesamtsalzmenge von 0,3% enthält, während früher die optimale Konzentration etwa des Zinks als Verunreinigung in an sich unnötig großen Mengen der bekannten Nährsalze gegeben werden mußte. Aus derselben Überlegung heraus ist es durchaus wahrscheinlich, daß noch weitere Schwermetalle und andere Elemente für den Pilz lebensnotwendig sind, die sich bislang noch als Verunreinigungen der Erkennung entziehen. Erscheinungen beginnenden Mangels an Eisen und Zink sind Myzelgewichtsdepressionen, an Kupfer mangelhafte Bildung und hellere Färbung der Sporen. Durch

Manganmangel hervorgerufene Beeinträchtigung der Sporenbildung ist zu erkennen, wenn die Myzelernten auf ¼ des Maximums gesunken sind. Die Säurebildung des Pilzes wird durch Kupfer schwach und durch Eisen und Zink stark gefördert. Diese beiden letzteren Elemente sind für die Säurebildung notwendig, während Mangan hierfür entbehrlich ist und sogar einen hemmenden Einfluß ausübt. Bortels (Berlin-Dahlem).

Ashworth, D., The Receptive Hyphae of the Rust Fungi. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 95—108.)

Verf.n wollte durch Untersuchungen an Melampsora larici-caprearum, M. larici-populina, Melampsoridium betulinum, Phragmidium violaceum, Endophyllum sempervivi, Coleosporium tussilaginis und Puccinia malvacearum die Funktion der rezeptiven Hyphen ermitteln. Bei diesen Rosten kommen die stomatären und interzellulären Hyphen ziemlich häufig an die Oberfläche. Sie fand, daß sich diese Hyphen unabhängig von Äzidien und Spermogonien entwickeln, außerdem kommen sie neben anderen Sporenbildnern vor. Puc. malv. bildet keine Spermogonien, auch hier beobachtete Verf.n rezeptive Hyphen. Die Sporenanlagen entstehen immer in der Nachbarschaft von Stomata. Nirgendwo konnten jedoch Verschmelzungen der rezeptiven Hyphen mit Spermatien festgestellt werden, wie vielfach vermutet wird. Die Frage nach der Funktion jener Hyphen bleibt also nach wie vor offen. Skallau (Berlin).

Pady, S. M., A Cytological Study of the Development and Germination of the Teliospores of Hyalopsora aspidiotus (Pk.) Magn. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 71—93.)

Dieser Rost besitzt ein im Rhizom von Phegopteris (Thelypteris) Dryopteris überwinterndes Myzel. Pyknidien und Äzidien kommen auf Abies balsamea vor. Im Frühjahr wächst das Myzel interzellular mit den Wedeln. Hier beginnt im Mesophyll dann die Bildung der Primordialzellen durch Verbreiterung der Hyphenspitzen. Der Inhalt einer Primordialzelle durchbricht die epidermale Zellwand und leitet danach die Bildung der Teleutosporen ein. Die Zahl der eingetretenen Primordien schwankt von 2 bis 8 in den Zellen der unteren Epidermis. Es werden solange Sporen gebildet (Kernteilungen und Membranbildungen), bis die Epidermiszelle vollständig von ihnen erfüllt ist. In jeder diploiden Spore erfolgt dann eine Kernverschmelzung, bei der Verf. eigentümliche Spiremstadien beobachtete. Nach einem kurzen Ruhestadium, wobei der Kern in der Prophase verbleibt, beginnt die Keimung der reifen Spore durch Ausbildung von Papillen, die die Zellwände durchbrechen; Inhalt und Kern treten unter Gestaltsveränderung in die Interzellularen. Das Promyzel wird gebildet. Verf. sah hierbei eigentümliche Kernteilungen, innerhalb der Kernwand erschienen freie Chromosomen und eine lange schmale Spindel, wobei die ersten die letzte ringförmig umgaben. Aus dem gewöhnlich vierzelligen Promyzel entwickeln sich vier ein-, meist jedoch zweikernige Basidiosporen. Skallau (Berlin).

Webb, P. C. R., The Cytology and Life-history of Sorosphaera Veronicae. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 41—52.)

Kernteilungen sind bei S. V. häufiger als sonst bei Plasmodiophoraceen.

Während Cook bei Ligniera fand, daß von 5000 Plasmodien nur eines Kernteilung aufwies, war hier das Verhältnis etwa 50 : 1. Die Kernteilung beginnt in der somatischen Phase mit der Anordnung der Chromatinkörperchen zu Linien. Verf. konnte für die Haploidphase zwei Paare von Chromosomen feststellen, von denen das eine länger als das andere war. In der späten Prophase bzw. frühen Metaphase trat das Saturnstadium (Osborne) ein. Der Kern nahm spindelförmige Gestalt an. In der Telophase teilte sich auch unter Annahme der Spindelform der Nukleolus. Von besonderer Bedeutung ist neben der Saturnbildung noch die Tatsache, daß der ganze Prozeß intranukleal verläuft, diese letzte Erscheinung fand auch Belar bei Chlamydophrys schaudinni. Vollständig entwickelte Plasmodien führen meist 24—28 Kerne, manchmal auch 32. Im Anschluß an die somatische Phase findet eine Degeneration des Nukleolus statt, es erscheinen im Zytoplasma die feinen Körnchen. Das Auftreten der Saturnbildung wird durch das Verharren der Chromosomen zwischen der Kernmembran und dem Kernkörperchen erklärt. Während des Übergangstadiums geht der Zusammenhang der Chromatinsubstanz nicht verloren. Es findet eine Kernverschmelzung statt. Die nun folgende heterotypische und homöotypische Teilung ähnelt sehr derjenigen bei höheren Pflanzen. Während der Reduktionsteilung findet eine Segmentierung des Plasmas statt, wie sie von den niederen Pilzen bekannt ist. Es werden nach der Äquationsteilung 60—70 Sporen gebildet. Skallau (Berlin).

Saß, J. E., Cytological Aspects of Physiological Sterility in Coprinus sterquilinus Fr. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 151—154.)

Verf. beobachtete bei Coprinus sterquilinus einen Fall von physiologischer Sterilität, wobei diese nicht absolut ist. Erfolgte die Bildung der Fruchtkörper zum erstenmal auf dem diploiden, homothallischen Myzel, so trat hochprozentige Sterilität ein, wenn sich eine sehr große Zahl von Fruchtkörpern gleichzeitig ausbildete; wurden die meisten sich auf einer Stelle entwickelnden Hüte entfernt, so trat normale Sporenbildung ein. Ältere Kulturen, die schon mehrfache Fruchtbildungen hinter sich hatten, wiesen immer eine hohe Zahl steriler Hüte auf. Diese sahen beim jungen Myzel frisch, weiß aus, sie blieben auch so bis zur Autolyse. Diejenigen der älteren Kulturen waren welk und schlaff, die Lamellen hatten braune bis schwärzliche Flecke. Nur die Sporen der dunklen Stellen hatten normale Größe, die anderen waren verschieden, und nur wenige von ihnen lebensfähig; sie entwickelten auf sterilisiertem Pferdedung Schnallenmyzelien mit fruchtbaren Hüten. Die Basidien der jungen Myzelien zeigten das normale Verhalten des Kernes bei der Sporenbildung, besonders bei der Ausbildung fertiler Sporen, die älteren dagegen meist nur 2 Kerne, auch drei wurden beobachtet. Immer jedoch wurden bei den steril bleibenden Gebilden 4 Sterigmen mit 4 Sporen hervorgebracht. Skallau (Berlin).

Nitimargi, N. M., Studies in the Genera Cytosporina, Phomopsis and Diaporthe. VII. Chemical Factors Influencing Sporing Characters. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 19—40.)

Das Gupta hatte an Cytosporina ludibunda, Brown, Horne und Mitter hatten an Fusarium schon beobachtet, daß

die Ausbildung von Sporen durch verschiedene Zusammensetzung der Nährböden beeinflußt werden konnte. Verf. verfolgte diese Beobachtungen an verschiedenen Stämmen von Phomopsis coneglanensis, P. citri und an Diaporthe weiter. Er bediente sich dabei der Methode von Seth und der statistischen Methode. Von einem bestimmten Standardnährmedium ausgehend, veränderte er den Gehalt an Asparagin und Glukose, diese ersetzte er teilweise durch Saccharose oder Fruktose, ferner gab er verschiedene Mengen von Äpfelsäure oder Na_2CO_3 zu. Die Sporenbildner waren sehr vielgestaltig, es kamen einfache Pyknidien bis zu mehr oder weniger unregelmäßigen Stromata vor, mit der Zu- oder Abnahme des Zuckers sowohl wie des Stickstoffs verringerte sich ihre Zahl wie auch ihre Größe. Die Reife konnte durch hohe Gaben von Glukose oder Asparagin verzögert werden, bei Stämmen mit großen Stromata bis zu mehreren Wochen. Wurde die Asparaginkonzentration von $\frac{1}{3}$ bis auf 10 g/l gesteigert, so trat bei denjenigen Stämmen, die auf dem Standardnährboden nur A-Sporen bildeten, ab 3 g/l ein kräftiger Schwund der Sporen ein. Bei Stämmen mit A- und B-Sporen ging die Zahl der B-Sporen beträchtlich zurück, die Länge nahm ebenfalls ab. Teilweise aufheben konnte man die hemmende Wirkung des Asparagins durch erhöhte Zuckergabe. Nirgendwo konnte eine Bildung von B-Sporen erzwungen werden. Im Gegensatz zu der Wirkung des Asparagins stand diejenige der Kohlehydrate. Bei Vermehrung des Zuckergehalts trat bei den Stämmen mit A- und B-Sporen eine Zunahme der B-Sporen ein, mit der eine Abnahme der A-Sporen einherging. Ausschließlich B-Sporen wurden bei 128 g/l erzeugt, auch die Stämme mit reiner A-Sporenbildung entwickelten nur noch B-Sporen. Lediglich Diaporthe bildete eine Ausnahme. Im dritten Fall, Stämme mit A-, B-, C-Sporen, kamen B- und C-Sporen zur Ausbildung, wobei der B-Typ vorherrschte. Die Sporen selbst zeigten eine Zunahme ihrer Größe. Versuche, Gestalt, Eigenschaften und die Bildung bestimmter Typen von Sporen durch Säure oder Alkali — wie oben angedeutet — zu beeinflussen, schlugen fehl. Skallau (Berlin).

Colson, B., The Cytology of the Mushroom Psalliota campestris Quel. (Ann. Bot. Vol. 49. 1935. p. 1—18.)

Psalliota campestris gehört u. a. zu denjenigen Basidiomyzeten, die vier oder auch zwei Sporen bilden können. Die zweisporigen Formen finden sich besonders bei den gezüchteten Arten. Verf.n sammelte ihr Material in verschiedenen Gebieten Englands, den gezüchteten Pilz bezog sie nur von einer Quelle. In den frühen Entwicklungsstadien unterscheidet sich die 4 sporige nicht von der 2 sporigen Form. Die jungen Fruchtkörperanlagen bestehen aus undifferenziertem Hyphengewebe, an dessen Basis sich strangförmige Hyphen anschließen. Beide besitzen langgestreckte, schmale, 3—10 kernige Zellen, deren Kerne verstreut oder angehäuft im Zytoplasma liegen. Ist der Fruchtkörper etwa 1 cm dick geworden, so kann man feststellen, daß der Stiel 6—10, der Hut 4—6, die Basidie und die anschließenden 2 oder 3 Zellen 2 kernig geworden sind. Die Tramaplatten besitzen 2—4 Kerne. Es findet also während der Ausbildung des Sporophores eine allmähliche Verminderung der Kernzahl in der strangförmigen Hyphe von ihrem Beginn bis zur Basidie statt. Diese wächst dann heran, die zwei, 1,4—1,6 μ großen Kerne bleiben zunächst erhalten. Nach dem Anwachsen der Basidie findet eine Kernverschmelzung mit anschließender zweimaliger Teilung statt. Fusion und Meiosis werden sehr eingehend beschrieben. Es

wurden 9 Gemini ermittelt, die Haploidzahl ist also 9, die Diploidzahl der Chromosomen für P. c a m p. 18, eine für Hymenomyzeten ungewöhnlich hohe Zahl. Bei der Bildung der Sterigmen, während derer die Kerne abwärts wandern, setzt die Trennung der zweisporigen von der viersporigen Form ein. Bei der ersten werden nur zwei Sterigmen ausgebildet, in die zweimal hintereinander je ein Basidialkern unter Gestaltveränderung eintritt. Es folgt eine Teilung der Sporenkerne, sehr wahrscheinlich noch eine zweite, denn es sind auch 8 kernige Sporen beobachtet worden. Bei der 4 sporigen Varietät bringt die Basidie 4 Sterigmen hervor, mit je einer Spore, in die ein Kern wandert. Keimungsversuche mit einer isolierten Spore schlugen fehl, erst bei Massenaussaaten war eine schwache Myzelbildung zu erreichen. Die Zellen des Myzels sind wie die der wild wachsenden und gezogenen Formen mehrkernig. Beim Vergleich der 4 sporigen mit der 2-sporigen Form kommt Verf.n zu der Ansicht, daß letztere die jüngere ist.
S k a l l a u (Berlin).

Backus, M. P., I n i t i a t i o n of the a s c o c a r p and associated phenomena in Coccomyces hiemalis. (Contrib. Boyce Thomps. Inst. Vol. 6. 1934. p. 339—379.)

Das Material zu den Untersuchungen stammte von P r u n u s c e r a s u s L. aus Wisconsin, New York, Niagara. Die Askokarpe von C o c c o m y c e s h i e m a l i s reifen im Frühjahr auf den abgefallenen überwinterten Blättern, ihre Sporen bilden die Hauptinfektionsquelle für das Laubwerk. Wenige Tage nach dem Befall werden charakteristische Cylindrosporiumacervuli gebildet. In großer Zahl wachsen die meist an der Unterseite sitzenden Makrokonidien heran, deren Sporen für starke Vermehrung des Pilzes Sorge tragen bis zum Blattfall im Herbst. Das interzellulare Myzel wächst quer durch das Blatt. Ohne äußerlich erkennbare Gründe treten dann plötzlich vereinzelt Mikrokonidien auf, Verf. vermutet physiologische Ursachen, da sie im Oktober erscheinen. Es findet ein allmählicher Übergang von Makro- zu Mikrokonidien statt, der Beginn der Bildung erfolgt in der Mitte eines Acervulus. Durch Züchtung konnte Verf. die Bildung der Mikrokonidien veranlassen, bevor die Makrokonidien ausgebildet bzw. gereift waren. Es gelang ihm jedoch nicht, die Mikrokonidien im Gegensatz zu C y l i n d r o s p o r i u m zum Keimen zu bringen. Sie wachsen auf demselben Myzel wie die Makrokonidien. Die Mikrokonidienträger sehen verschieden aus, verzweigt usw., 25 μ hoch. Die Mikrokonidien selbst sind sehr klein, mit großem Kern, an ihrer Ansatzstelle sehr dünn, sie kommen meist spät im Jahre. Sie haben bazilliformen Typ, ähneln den Spermatien von manchen autonomen Askomyzeten, Flechten und roten Algen. Im Spätsommer bis in den Herbst hinein bilden sich dann im Mesophyll, oft in unmittelbarer Nähe eines Acervulus nesterartige, rötlich aussehende plektenchymatische Gewebe, aus denen sich bald reichlich Archikarpe entwickeln, die gedreht sind. Von hier aus wächst eine trichogyne Hyphe in das Mikrokonidienlager. Man kann auch beobachten, wie Mikrokonidien sich an sie anklammern. Jedoch ist vom Verf. nie eine Verschmelzung zwischen Trichogyne und Spermatium beobachtet worden. Auf Grund mancher Analogien hält er C. h. für einen homothallischen Pilz. Ungeklärt ist noch das Verhalten des Kernes bei all diesen Vorgängen. S k a l l a u (Berlin).

Samuel, Geoffrey, and Bald, J. G., On the use of the primary lesions in quantitative work with two plant viruses. (Annals Appl. Biol. Vol. 20. 1933. p. 70—99.)

Die Vorsichtsmaßregeln, die man bei der Anwendung der Methode von Holmes zur quantitativen Zählung des Tabakmosaiks anwenden muß, wurden beachtet. Eine Methode wurde beschrieben, bei welcher man eine Standard-Impftechnik gebraucht, verbunden mit Vergleichen von Vira auf entgegengesetzten Hälften ein und desselben Blattes. Auch „Tobacco spotted wilt" bildet primäre Läsionen auf Tabakblättern, die für quantitative Zwecke geeignet sind; Resultate, die mit Tabakmosaik erreicht wurden, wurden auch mit denen von „spotted wilt" verglichen. Anwendungsmöglichkeiten der Methode sind besprochen und Beispiele gegeben, die die graphische Darstellung von „ageing" (Änderung von Virulenz im Laufe der Zeit) von ausgepreßtem Virus der „tobacco spotted wilt" erlauben: die Kurve war logarithmisch. Nicol (Rothamsted).

Enzymologie und Bakteriophagie.

Virtanen, A. I., Nordlund, M., and Hollo, E., Fermentation of sugar by the root nodule bacteria. (Biochem. Journ. Vol. 28. 1934. p. 796—802.)

Verff. studierten die Gärung von Glykose mit Hilfe eines Stammes von Rhizobium trifolii aus Rotklee. Diese Gärung war dem Buttersäure-Typus zuzuschreiben: in den frühesten Stadien fanden Verff. beträchtliche Mengen dl-Milchsäure, welche sich langsam in Buttersäure, CO_2, H_2 und kleine Mengen Essigsäure und Äthylalkohol verwandelten. Die gleiche Gärung wurde bemerkt, wenn man zerquetschte Knöllchen (aus Pflanzen unter sterilen Bedingungen gewachsen) anstatt reiner Bakterien verwandte.

Verff. bemerkten, daß das Wachstum von Knöllchenbakterien durch Zusatz von einem Extrakt von Aspergillus niger stark gefördert wird, doch ist leider in dieser Arbeit hierfür kein Beweis zu finden.

Nicol (Rothamsted).

Moycho, W., Recherches sur la protéase chez Bacterium prodigiosum. (A. Soc. Bot. Pol. Vol. 10. 1933. p. 417—440.) [Poln. m. franz. Zusfassg.]

Zwei Fragen wollte Verf. durch seine Untersuchungen beantworten: 1. Ist die Abscheidung der Protease von Bact. prodigiosum ein vitaler oder postmortaler Prozeß, 2. kann die Fähigkeit zur Proteolyse dieses Bakteriums unabhängig von seinem Wachstum durch Veränderung der Lebensbedingungen — wobei entweder die H-Ionen- oder die Phosphatkonzentrationen verschoben werden — beeinflußt werden. Im Entwicklungsstadium der Kulturen trat keine Protease auf, dagegen wohl nach dem Absterben der Zellen. Von zwei gleichen Kulturen wurde die erste sich selbst überlassen, die zweite dagegen des öfteren geschüttelt. In diesem Falle trat eine Steigerung der Entwicklung von 50—150% auf, aber proteolytische Eigenschaften waren nicht zu beobachten, im Gegensatz zu der in Ruhe belassenen Kultur. Sehr junge Stämme, die noch kein Prodigiosin gebildet hatten, wurden mit Toluol, Äther oder Chloroform behandelt. Protease wurde nicht ausgeschieden. Im sauren Gebiet — $p_H = 4,5—6,0$ — waren die proteolytischen Eigenschaften besser entwickelt als im alkalischen, trotzdem das Bakterium nicht gut gedieh. Starke Phosphatkonzentrationen beschleunigten zwar die Entwicklung der Kulturen, schwächten aber die Proteolyse bis zu 300%. Verf. schließt aus seinen Versuchen, daß bei Bact. prodigiosum die Protease nur nach dem Absterben außerhalb der Zelle nachweisbar ist; die Entwicklung des Bakteriums und die Fähigkeit zur Proteolyse sind voneinander unabhängig. Skallau (Berlin).

Johnson, M. I., Über die proteolytischen Enzyme von Aspergillus parasiticus. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 224. 1934. S. 163—175.)

Auf Magermilch mit 5% Glukose gezüchtete Pilzdecken von Aspergillus parasiticus wurden auf ihren Gehalt an verschiedenen proteolytischen Enzymen untersucht. Es wurden bisher 4 verschiedene Komponenten gefunden: eine Proteinase, eine Carboxypolypeptidase, eine Aminopolypeptidase und eine Dipeptidase. Einige Eigenschaften der Enzyme sowie ihre Entstehung wurden studiert und Methoden zu ihrer Extraktion, Trennung und Bestimmung ausgearbeitet. Die Aminopolypeptidase konnte praktisch frei von anderen proteolytischen Enzymen gewonnen werden.

R. Koch (Berlin).

Gorrieri, I., Au sujet des divers types du bacille diphtérique. (I. communication.) (Soc. Intern. Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 314—317.)

Verf. hat die fermentative Wirkung von Diphtheriebakterien auf Stärke untersucht und kommt zu dem Ergebnis, daß die Fähigkeit, Stärke aufzulösen, fast alle Stämme aufweisen, die pathogenen sowohl als auch die nichtpathogenen. Diese biochemische Eigenschaft kann also nicht zur Unterscheidung hochpathogener, schwach pathogener und gutartiger Formen des Bakteriums herangezogen werden. Bortels (Berlin-Dahlem).

Doby, G. v., Enzyme und Salzionen. IV. Saccharasekonzentration in Penicillium glaucum bei Stickstoffmangel. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 213. 1932. S. 71—82.)

Die Saccharasekonzentration in Schimmelpilzen und in einigen höheren Pflanzen (Zuckerrüben, Kartoffeln) ist von deren Ernährung mit anorganischen und organischen Stoffen abhängig. Auch die Art und Menge der in der Nährlösung gebotenen Stickstoffverbindungen beeinflußt die Saccharasebildung in Penicillium glaucum. Als N-Quellen wurden geprüft $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, $NaNO_3$, $NaNO_2$, Alanin, Asparagin, Harnstoff und Pepton in 7 Abstufungen von 0,0035 bis 0,28% Stickstoff in Rohrzucker-Nährlösungen verschiedener Konzentration. Dabei wurden Beobachtungen über die Bildung von Pilzsubstanz unter dem Einfluß der verschiedenen N-Quellen gemacht. $NaNO_2$ war als Nährstoff ungeeignet. Die Saccharase des Pilzes behielt unter den verschiedensten Bedingungen das gleiche Wirkungsoptimum beim $p_H = 4,5$ und einer Temperatur von 50° C. Die Saccharasekonzentration war um so höher, je geringer die Stickstoffkonzentration war. Hohe Enzymkonzentration deutet also auf N-Mangel hin, der sich zahlenmäßig bestimmen läßt. Eine Verwertung dieses Ergebnisses zur Bestimmung pflanzenlöslichen Bodenstickstoffs scheiterte an der mangelhaften Entwicklung des Pilzes auf Bodenproben. R. Koch (Berlin).

Bechhold, H., Ferment oder Lebewesen? (Kolloid-Ztschr. Bd. 66. 1934. S. 329—340 und Bd. 67. 1934. S. 66—79.)

Von den nur in Gegenwart lebender Zellen vermehrungsfähigen, also auf den üblichen Nährböden nicht züchtbaren, subvisiblen und filtrierbaren Vira war ebenso wie von den verschiedenen Bakteriophagen nicht bekannt, ob diese Gebilde zu den Fermenten oder zu den Lebewesen zu zählen sind. Es handelte sich hierbei in erster Linie um eine Frage der Teilchendimensionen, die vom Verf. und seinen Mitarbeitern mittels verschiedener von-

einander unabhängiger Methoden erforscht wurde. In einigen Fällen konnten die Teilchen mit Hilfe der Ultraviolett-Mikrophotographie sichtbar gemacht werden. Die Bestimmung der Teilchengröße durch Ultrafiltration führte zu annähernd richtigen Werten, die durch die Zentrifugiermethode noch verbessert werden konnten. Die Größenbestimmung subvisibler Teilchen durch die Sedimentationsgeschwindigkeit in schnellaufenden Zentrifugen wird vom Verf. als das beste Verfahren angesehen. Es ergab sich, daß die Teilchen der gleichen Virusart kugelförmige Gebilde gleicher Größe waren. Die verschiedenen Vira und Bakteriophagen zeigten aber ganz verschiedene Teilchengrößen. So besteht eine fast ununterbrochene Reihe von der unteren Grenze der mikroskopisch sichtbaren und abbildbaren Mikroorganismen, den Bakterien in der Größe von etwa 500 mμ bis herunter zu subvisiblen Gebilden von 20 mμ. Verf. hält es somit für erwiesen, daß die Bakteriophagen und die subvisiblen Vira Lebewesen sind. Die verschiedenen Bakteriophagen sind über ein ebenso ausgedehntes Größengebiet verstreut, wie die verschiedenen Bakterienarten und dürften eine Organismengruppe für sich bilden. Neben 6 verschiedenen Bakteriophagen wurden die Erreger der Pockenvakzine, der Kanarienkrankheit, der Hühnerpest, der Herpes simplex und der Mosaikkrankheit des Tabaks untersucht. Ein Bakteriophage wurde in synthetischer Nährlösung frei von beigemengten Kolloiden gewonnen. Die Teilchen konnten im Ultramikroskop beobachtet werden und ließen sich durch Zentrifugieren in Mengen von etwa 1 mg gewinnen.

R. Koch (Berlin).

Knorr, M. und Ruf, H., Phagtrocknung und Phagauswertung. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 133. 1935. S. 289—298.)

Es gibt Phagen, die gegen Eintrocknen außerordentlich empfindlich sind, und solche, denen das Eintrocknen nichts oder nur wenig schadet. Die Widerstandsfähigkeit gegen Eintrocknen ist keine wechselnde, sondern eine bleibende Eigenschaft der einzelnen Phagen. Eine Erhöhung der Phagenkonzentration vermag bei gleichbleibender Brühekonzentration die Widerstandsfähigkeit der Phagen nicht nachweisbar zu beeinflussen. Die Phagvernichtung ist in dem Augenblick am stärksten, in dem ein eben noch feuchter Tropfen trocken wird.

Es wurde das Plattengußverfahren nach Bail und das Verdünnungsverfahren in Brühe nach Appelmans und Werthemann verglichen. Beide Methoden leisteten das gleiche, das Bailsche Verfahren ist das einfachere. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Mikrobiologie der Nahrungs-, Genuß- und Futtermittel.

Wallace, G. I., and Tanner, F. W., Microbiology of frozen foods. II. Studies on frozen fruits and vegetables. (Fruit Products Journ. Americ. Vinegar Industry. May and August 1934 and January 1935.)

Das Ergebnis der sehr umfangreichen Untersuchungen ist, daß für die Haltbarkeit gefrorener Obst- und Gemüsekonserven nicht Zahl und Art der in ihnen enthaltenen Mikroorganismen, sondern die Art der Frucht, ihre Qualität und die Beschaffenheit des Behälters maßgebend sind. Am geeignetsten haben sich die bekannten Blechbüchsen erwiesen. Gefrorenes Obst von ausgesuchter Qualität behält so sein frisches Aussehen im Gegensatz zum sterilisierten Obst, ein Vorteil der Gefriermethode, der bei Gemüsekonserven nicht in dem Maße feststellbar ist. Von den Schimmelpilzen und

Bakterien, die zuweilen in größerer Menge vorkommen, jedoch die Konserven erst dann angreifen, wenn diese bei Temperaturen über 0° C aufbewahrt werden, haben manche 2 Jahre in den gefrorenen Früchten überdauert. Die widerstandsfähigen Bakterien sind hauptsächlich Sporenbildner.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Luchetti, G., Comment se comporte le "Geotrichum javanense, Ver." dans le lait? (Soc. Intern. Microbiol. Boll. della Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 490—491.)

Die von Verona aus einem dem Yoghurt ähnlichen Getränk isolierte Geotrichum-Art wurde von Verf. auf ihr biochemisches Verhalten in Milch untersucht. Obwohl sich in dem Getränk typische Hefen nicht nachweisen ließen, wurden doch beträchtliche Alkoholmengen aufgefunden, deren Bildung hauptsächlich dem Geotrichum javanense zugeschrieben wird, während Bacterium bulgaricum, das, wie auch Streptococcus lacticus neben Geotrichum Bestandteil der Flora des javanischen Milchgetränkes ist, nur sehr wenig Alkohol bildet.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Kühlmann, H., Der biologische Nachweis der Dauererhitzung der Milch. (Arbeiten a. d. Reichsgesundheitsamte. Bd. 67. 1935. S. 511—533.)

Die Nachprüfung einiger Verfahren, die zum Nachweis der Dauererhitzung der Milch empfohlen werden, hatte folgendes Ergebnis: Beim Labserumverfahren nach Hock konnten Hocks Angaben und Zahlenwerte nur hinsichtlich der rohen und unter 60° erhitzten Milch bestätigt werden. Dauererhitzte Milch ergab dagegen sehr viel Fehlergebnisse. Auch die Schern-Gorlische Tierkohlereaktion und die Potsdamer Abänderung der Schern-Gorli-Reaktion erwiesen sich als ungeeignet zum Nachweis der Dauererhitzung der Milch. Bei der Tierkohlereaktion bildete auf 62—65° dauererhitzte Milch, entgegen den Angaben von Kohn und Klemm, innerhalb von 2 Std. stets einen schwarzen Ring in der Rahmschicht. Und bei der Potsdamer Abänderung ohne Komplement trat der rote Blutkörperchenpunkt, der von Standfuß und Sörrensen als Kriterium für eine Dauererhitzung auf über 63° angesehen wird, bei den Versuchen Verf.s häufig schon bei Dauererhitzung unter 62° ein. Lediglich die Schern-Gorlische Originalmethode lieferte brauchbare Resultate. Trotzdem befriedigte auch sie nicht ganz, vor allem weil die Ringbildung häufig sehr schwach ausfiel und leichte Erschütterungen der Röhrchen die Reaktion verwischten. Das Verfahren soll sich wesentlich deutlicher und übersichtlicher gestalten, wenn in folgender Weise vorgegangen wird:

In Uhlenhut-Gläschen von 6 cm Länge und 11 mm Durchmesser, die in einem Uhlenhut-Reagenzglasgestell aufgehängt sind, werden 2 ccm der zu untersuchenden Milch (am besten zimmerwarm) mit 1 Tropfen einer 2 proz. Aufschwemmung von Meerschweinchen-Blutkörperchen in physiologischer Kochsalzlösung gemischt (die Blutkörperchen müssen möglichst frisch sein). Nach 2 Std. Aufbewahrung im Brutschrank werden die Röhrchen bei auffallendem Licht betrachtet.

Hat sich nach 2, längstens nach 3 Std. in der Rahmschicht ein rötlichbrauner oder rötlich-gelber Ring gebildet, so ist die Milch roh oder unter 62° erhitzt. Bleibt die Ringbildung aus und entsteht dafür ein rötlicher kreis- oder ringförmiger Bodensatz, so ist die Milch über 62° dauererhitzt. Es gelingt mit dieser Methode länger als 10 Min. dauernde Unterschreitung

der Mindesttemperatur von 62° nachzuweisen, ferner den Zusatz von Rohmilch zu pasteurisierter Milch bis zu 1 Teil Rohmilch auf 4 Teile pasteurisierte Milch. Der Zusatz von pasteurisierter Milch zu Rohmilch ist dagegen nicht feststellbar. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Knudsen, S., Über die Korrelation zwischen der Qualität und dem Katalasegehalt der Butter. (Königl. Tierärztl. u. Landw. Hochschule Kopenhagen. Jahrb. 1935. S. 51—57.)

In Fortsetzung früherer Untersuchungen behandelt Verf. die Brauchbarkeit der Katalaseprobe für die bakteriologische Butterkontrolle und zwar auf Grund vergleichender Prüfung von rund 16 000 seit dem Jahre 1932 laufend untersuchten Handelsbutterproben. Von der Durchschnittszensur „K" ausgehend, wurden, je nach Qualität, Zuschläge und Abzüge durchgeführt und diese Werte mit den erhaltenen Katalasezahlen durch Berechnung des Korrelationskoeffizienten in Beziehung gebracht. Dabei ergab sich folgendes:

Punktierung	Korrelationskoeffizient
K bis K + 2,1	— 0,85 ± 0,06
K — 0,1 bis K — 4,1	— 0,96 ± 0,01

Diese Werte stehen in scharfem Gegensatz zu denen, die Demeter und Christiansen (Weltmilchkongreß 1934) bei Untersuchung von 150 Butterproben verschiedenster Qualität erhalten haben. Wenn neuerdings Loftus-Hills, Sharp und Bellair (Journ. Dairy Res. 1934) gefunden haben, daß die Katalaseprobe ebensowenig wie die bakteriologische Prüfung bei Beurteilung der Kühlhausbutter zu gebrauchen ist, so berührt das die vorliegenden Ergebnisse insofern nicht, als hier nach Verf.s Ansicht die „chemischen" Fehler maßgebender sind als die „bakteriologischen".
K. J. Demeter (Weihenstephan-München).

Starigina, L. und Haldina, M., Untersuchung der Mikroflora des Kefirs, zwecks Bereitung desselben aus Reinkulturen. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 88—102.) [Russ.]

Das Stroma der untersuchten, aus dem nördlichen Kaukasus stammenden Kefirkörner bestand in seiner ganzen Masse aus Fäden, zwischen denen Hefezellen gelegen waren. Das Stroma wird vornehmlich von Milchsäurestäbchen und einer geringen Anzahl peptonisierender Bakterien gebildet. Kokkenformen (Streptokokken) fehlen vollständig. Beim Kultivieren der Gärmasse des Kefirs wurden folgende Bakterien isoliert: Streptococcus lactis O. J., 2 Typen von Streptobacterium plantarum O. J., die sich voneinander im Umfang, in der Energie der Säurebildung und der Fähigkeit zur Vergärung von Kohlehydraten unterscheiden; ferner peptonisierende Bakterien, davon eine mit Sporenbildung, die sich nach Gram färbte und am 4.—5. Tage Milch peptonisierte, die andere wies keine Sporen auf, färbte sich nicht nach Gram und peptonisierte Milch nach 24 Std. Von Hefepilzen wurden Torula Kefir H., Saccharomyces Kefir F und Mycoderma isoliert. Das Fehlen der Streptokokken in den Kefirkörnern und ihr Vorhandensein in der Gärmasse beweist, daß dieselben während der Kefirbereitung in den Kefir gelangen. Im fertigen Kefir besteht die gesamte Mikroflora aus 94% Streptococcus lactis, 6% Milchsäurebakterien und 0,1% Hefe. In betreff der Bedeutung der einzelnen Bakterien ist die Säurebildung und die Gerinnung der Milch den Streptokokken zuzuschreiben, die Konsistenz des Kefirs ist von Milchsäure-

bakterien abhängig, während die peptonisierenden Bakterien dem Kefir seinen spezifischen Geschmack verleihen; Hefezellen vermehren sich in Kefir langsamer und bilden viel weniger Alkohol, als reine Hefekultur in Milch. Dieser Umstand ist nicht von der sauren Reaktion des Kefirs oder vom Mangel an Stickstoffnahrung abhängig. Bei Anwendung kombinierter Gärmasse kann Kefir mittels Reinkulturen bereitet werden. Die Gärmasse besteht aus 100 Teilen Streptokokken, 100 Teilen Milchsäurebakterien und 50 Teilen Hefe. Beim Angären pasteurisierter Milch werden auf 100 Teile dieser Gärmasse 4 Teile peptonisierende Bakterien enthaltender Gärmasse hinzugefügt. A. Imšenecki (Leningrad).

Samzewitsch, S., Untersuchung der peptonisierenden Bakterien des Kefirs. (Microbiology. Vol. 3. No. 1. 1934. p. 103—109.) [Russisch.]

Von den aus Kefirkörnern isolierten Bakterien lassen 2 Arten nicht sporentragender Bakterien sich mit Proteus vereinigen, die übrigen mit Flavobacterium flavum (Fuhrmann) Berg und Pseudomonas viscosa (Frankland) Migula. Die isolierte sporentragende Form kann zu Bacillus lactis Flügge gerechnet werden. Peptonisierende Bakterien wurden im Kefir beständig gefunden, jedoch in geringer Menge. Die nicht sporentragenden peptonisierenden Bakterien wirken günstig auf die Konsistenz des Kefirs und verleihen dem Kefir seinen charakteristischen Geschmack. In Reinkulturen peptonisieren sie Milch schon nach 24 Std., im Kefir verstärken sie die Eiweißzersetzung. Bei gemeinsamem Kultivieren von Streptococcus lactis und peptonisierenden Bakterien wurde festgestellt, daß die durch die peptonisierenden Bakterien hervorgerufene Proteolyse der Milch die Vermehrungsenergie der Streptokokken verstärkt, im weiteren Verlauf hemmt die sich bildende Milchsäure die peptonisierenden Bakterien. Wiederholtes Schütteln von Kefir verursacht bei Säuregehalt über 60—70° T den Untergang der petponisierenden Bakterien. Verf. deutet diese Erscheinung durch Zerstörung der durch die fermentative Tätigkeit der peptonisierenden Bakterien in den Kaseinbrocken geschaffenen Schutzzone. Wie aus den Versuchen hervorgeht, sind die isolierten Bakterien nicht pathogen und ihre Anwendung im Betrieb folglich gefahrlos. A. Imšenecki (Leningrad).

Hartong, B. D., Oxydations-Reduktions-Potentiale während der Bierbereitung. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 51. 1934. S. 409—411.)

Die durchgeführten Versuche haben vorwiegend Bedeutung für die biologische Haltbarkeit des Bieres. Zu Beginn der Gärung erlangt die Würze stark reduzierende Eigenschaften durch die Hefe. Diese vermehrt sich in diesem Stadium kräftig und verbraucht den Sauerstoff, der während des Kühlens aufgenommen wurde. Beim Einblasen von Luft wird das Redox-Potential erhöht. Das vegetative Stadium geht über in das Atmungsstadium. Hört die Zufuhr von Luft auf, so geht die Vergärung weiter und das Redox-Potential sinkt wiederum usw. Der gleiche Vorgang tritt im fertigen Bier auf. Am Ende der Lagerung wird ein niedriges Potential erreicht, die Gärung im Lagertank hört auf. Tritt nun später irgendwie Luft hinzu, so wird das System oxydiert. Wie im Gärkeller fängt die Hefe jetzt wieder an zu reduzieren, das Bier vergärt weiter und die Möglichkeit zu Hefetrübungen ist

gegeben. Durch Erniedrigung des ph-Wertes wird das Redox-Potential erhöht. Je höher das Redox-Potential, desto geringer die Aufnahmefähigkeit für Luftsauerstoff. Es ist deshalb einleuchtend, warum seit Jahren einem niedrigen ph-Wert zugestrebt wird. Denn im Lagerkeller wird bei einem niedrigen ph-Wert ein Gleichgewichtszustand erreicht, bei welchem die Anregung zu erneuter Gärung geringer ist.

Die reduzierende Wirkung in Würze und Bier wurde mit Hilfe des Indikators Dichlorphenol -Indophenol untersucht. Als Maß verwendete Verf. die Entfärbungszahl, die in einfachem Zusammenhang mit dem Redox-Potential steht. Die wichtigste Komponente des Oxydations-Reduktions-Systems, das in Würze und Bier gefunden wurde, ist eine Verbindung von Eiweiß und Gerbstoff mit freier SH-Gruppe. Heuß (Berlin).

Stockhausen, F., Biologische Prüfung der neuen Enzinger-Union-Sterilisiervorrichtung für Bierfilter. (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 51. 1934. S. 393—395.)

Bei der gewöhnlichen Art der Filtermassereinigung wird diese im Filtermassewaschapparat erst mit warmem Wasser ausgewaschen, darauf wird die Temperatur gesteigert und die Höchsttemperatur, die meist um 80° C herum liegt, eine Zeitlang gehalten. Durch Zulauf von frischem Wasser wird darauf gekühlt und die so behandelte Masse in Kuchen gepreßt und in das Filter eingelegt. Es läßt sich dabei nicht vermeiden, daß sie mit Luft und den Händen des Personals in Berührung kommt, so daß es nur schwer gelingt, reine sterile Masse in das Filter zu bekommen.

Bei dem Enzinger-Unionverfahren wird die Filtermasse nur warm ausgewaschen, also nicht erhitzt, und dann gepreßt und eingelegt. Das Sterilisieren der Masse geschieht im Filter selbst, indem man warmes Wasser im Kreislauf durch das Filter drückt, dieses auf Temperaturen um 80° C herum erhitzt und langsam wieder abkühlt.

Verf. hat beide Verfahren nebeneinander einer eingehenden biologischen Prüfung unterzogen. Die nach dem alten Verfahren bei 83° C behandelte Filtermasse war am Schluß des heißen Auswaschens nicht völlig steril. Ihr Keimgehalt stieg während des kalten Nachwaschens und der Behandlung in der Presse. Bei dem neuen Verfahren zeigten die eingelegten Filterkuchen einen hohen Keimgehalt, weil ja die Masse noch keiner hohen Temperatur ausgesetzt worden war. Durch das Erhitzen im Filter wurde sie praktisch steril, in dem durchgedrückten Wasser waren nach dem Abkühlen lediglich thermophile Bakterien nachweisbar, die technisch ohne Bedeutung sind. Die neue Sterilisiervorrichtung hat sich also als brauchbar erwiesen, sie hat den Vorteil, daß nicht nur die Filtermasse sterilisiert wird, sondern auch das Filter selbst mit seinen vielen Kanälen und Nebenarmaturen, die ja alle mit dem heißen Wasser in Berührung kommen. Wesentlich für den Effekt ist jedoch, daß dieses Wasser nicht stehenbleibt, sondern in fortwährendem Umlauf während der Erhitzung bleibt. Durch die Strömung werden die Keime mit fortgerissen und können nun, in der Flüssigkeit schwebend, leichter und in kürzerer Zeit abgetötet werden, als wenn sie an bestimmten Stellen festsitzen. Heuß (Berlin).

Janensch, J., Biologische Mitteilungen. Ist im Vergleich zu früher ein Fortschritt bezüglich des Reinheitsgrades von Transportfässern zu verzeichnen? (Wochenschr. f. Brauerei. Bd. 51. 1934. S. 372—375.)

Im Brauereibetrieb ist vielfach fälschlich die Ansicht verbreitet, daß die Transportfässer durch frisches Pichen steril werden. In Wirklichkeit werden die Fässer durch das Pichen zwar keimärmer, keinesfalls aber steril. Die Einwirkungszeit der Hitze beim Pichen ist ja nur kurz, jedenfalls viel zu kurz, um sehr widerstandsfähige, insbesondere sporenbildende Keime (wilde Hefen usw.) unschädlich zu machen. Die Hitze verteilt sich auch nicht völlig gleichmäßig auf das Faßinnere, es wird aus diesem Grunde immer Stellen im Faßinneren geben, die bei der Pichung von der Höchsttemperatur nicht erfaßt werden. Die biologische Untersuchung von Spülwässern aus frisch gepichten Fässern ergibt deshalb auch fast stets, daß in ihnen noch Keime enthalten sind. Eine wesentliche Verbesserung der biologischen Reinheit kann man durch Einnebeln oder Einschwefeln der gut gepichten Transportfässer erzielen. Im ersten Fall werden die Fässer nach dem Passieren der Faßreinigungsmaschine 1 Tag vor dem Befüllen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel, beispielsweise einer 1proz. Lösung von Flammon, eingenebelt. Die Fässer werden mit einem Spund verschlossen und bleiben über Nacht der Einwirkung des Mittels ausgesetzt. Darauf wird das Desinfektionsmittel durch Ausspülen sorgfältig entfernt und das Faß gefüllt. Desgleichen müssen die Fässer mit biologisch einwandfreiem Wasser ausgespült werden, die mit Schwefel behandelt wurden. Derart behandelte Fässer erwiesen sich bei der Prüfung als praktisch steril.

Heuß (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Gibson, T., An investigation of the Bacillus Pasteuri group. I. Description of strains isolated from soils and manures. (Journ. of Bacter. Vol. 28. 1934. p. 295—308.

Zur Isolierung der Harnstoffzersetzer wurden 3 Methoden angewendet: 1. Anreicherung in Bouillon (Erdextrakt) mit 5—10% Harnstoff; 2. Beimpfung von harnstoffhaltigen Nährlösungen mit Verdünnungen des Ausgangsmaterials und 3. Kulturen auf Nähragar mit 5—10% Harnstoff. Insgesamt wurden 94 Stämme isoliert, die frisch isoliert und nach längeren Zeiträumen untersucht wurden. Eine Einordnung der Stämme in die bisher beschriebenen Arten wurde nicht vorgenommen, da die Unterlagen früherer Untersucher mit zu verschiedenem Material und unter zu verschiedenen Kulturbedingungen gewonnen wurden, um eine einwandfreie Klassifizierung zu ermöglichen. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt der Verf. zu dem Ergebnis, daß eine systematische Einordnung im jetzigen Zeitpunkt nur als eine vorläufige und künstliche Aufteilung angesehen werden kann.

Richter (Kiel).

Newton, J. D., A study of the composition and utilisation of Alberta peats. (Annals Appl. Biol. Vol. 21. 1934. p. 251—266.)

Die Wirkung von N, P und K auf die mikrobiologische Zersetzung reiner Zellulose war unbedeutend, aber nach der Zugabe von Mg + S + Ca + Fe beschleunigte diese Zersetzung sich in reinem Zustand sehr, wobei die Pilze eine wichtigere Rolle zu spielen schienen als die Bakterien. Auch die Zahl der ammonifizierenden Bakterien bei Zellulosegärung vermehrte sich, parallel zu der Zahl sekundär entstehender Stoffe.

Zum Teil behandelt diese Arbeit einige lokale (kanadische) Torfe, in bezug auf ihre Zellulosemenge und -zerstörung. Nach Laboratoriumsver-

suchen zweifelt Verf. an einer nützlichen Wirkung der Kunstdünger in bezug auf den Ernteertrag des Torfbodens. Nicol (Rothamsted).

Neri, Ph., Neues Gärungsröhrchen (Y-förmiges Röhrchen) zur Untersuchung des Bacterium coli in den Gewässern. (Zentralbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. Bd. 132. 1934. S. 437—440.)

Es wird ein neues Gärungsröhrchen in zwei Größen (für 10 und 20 ccm zu untersuchendes Wasser) zum Nachweis von Bact. coli empfohlen. Es besteht aus einem unteren Teil mit seitlichem Arm, der im Winkel von 45° nach aufwärts gerichtet ist, und aus einem oberen, engeren und kürzeren Teil, der als Glocke zum Auffangen des Gases dient. Der Verschluß des Seitenröhrchens erfolgt anstatt mit Watte am besten durch ein einfaches Glasröhrchen. — Zur Beurteilung der Trinkfähigkeit eines Wassers muß eine beachtliche, entsprechend fraktionierte Menge untersucht werden. Nimmt man 300 ccm an, so kann die Fraktionierung in 20 Röhrchen (10 Röhrchen zu 20 ccm und 10 Röhrchen zu 10 ccm) oder in 30 Röhrchen zu 10 ccm vorgenommen werden.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Schmidt-Lange, W., Beschleunigte Ermittlung des Keimgehaltes in Wasserproben und Bakteriensuspensionen. (Archiv f. Hyg. u. Bakt. Bd. 113. 1934. S. 120—135.)

Beschreibung einer Methode, die sich zur Bestimmung des Keimgehaltes von allen Bakteriensuspensionen, insbesondere aber von Wasserproben eignet, auch dann, wenn die Bakterien vorher schädigenden Einflüssen ausgesetzt waren. Unter besonders günstigen Umständen ist bereits 4 Std., in den allermeisten Fällen 6 Std. und bei ganz außergewöhnlichen Verhältnissen mindestens 8 Std. nach dem Beginn der Untersuchung ein verwertbares Resultat zu erhalten. Gegenüber dem amtlich empfohlenen Gelatineverfahren werden also wenigstens 40 Std. gewonnen. Die im Schnellverfahren erhaltenen Werte stimmten bei Zählung von Reinkulturen mit dem Gelatineverfahren sehr gut überein, bei Wasserproben lieferte das Gelatineverfahren allerdings in der Regel etwa den 5fachen Wert. Das Schnellverfahren besteht nun darin, daß auf Agarplatten (es kommt nur die Oberflächenkultur in Frage, um den Bakterien freies Wachstum zu ermöglichen) eine bestimmte Menge Wasser zum Abdampfen gebracht wird: bei sehr reinem Wasser in gewöhnlicher Petrischale 10 ccm. Bei sehr keimreichen Proben kann Verdünnung angebracht sein, ist aber nicht so notwendig wie bei anderen Methoden; denn es fällt die Gefahr der Verflüssigung fort und die einzelnen Kolonien liegen bei der Auszählung nach kurzer Zeit meist noch isoliert. Das Abdampfen soll möglichst nicht über 30 Min. Zeit in Anspruch nehmen und bei etwa 50° vor sich gehen. Mit gutem Erfolg ist hierzu ein „Fön" benutzt worden, der bei der Stellung „warm" einen Luftstrom von 52—55° in der Nähe der Öffnung erzeugt. Am besten bewährte sich die Zuführung der warmen Luft von der Seite her auf die horizontal stehenden Platten. Die Beobachtung der 4—8 Std. bei 37° bebrüteten Platten erfolgt am günstigsten bei etwa 40facher Vergrößerung.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Amati, A., et Gualandi, C., La flore microbienne de quelques eaux des cavernes du sous-sol des environs de Bologne. (Boll. della Sez. Ital. Soc. Intern. di Microbiol. Vol. 6. 1934. p. 215—218.)

Die qualitative Untersuchung der Mikroflora der unterirdischen Gewässer in den Grotten „La Spipola“ und „M. Gortani“ bei Bologna ergab die Anwesenheit mehrerer die Gelatine verflüssigender Keime, eines Fluorescenten sowie eines Farbstoffbildners vom Typus Bac. violaceus.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Pisu, I., Variations muqueuses et rugueuses du „B. coli“ dans une eau carsienne. (Soc. Intern. Microbiol. Boll. Sez. Ital. Vol. 6. 1934. p. 54—59.)

Das Wasser der Stadt Fiume, das einem unterirdischen Wasserlauf entstammt, enthält Faktoren, die eine Umwandlung der S-Form des Bac. coli über eine Zwischenstufe in den R-Typ bewirken. Die schleimige Zwischenform ist gekennzeichnet durch größere Einzelzellen und durch den nicht vollständigen Verlust der Fähigkeit, Laktose zu vergären und Indol zu bilden und durch negative Methylrot- und Voges-Proskauer-Reaktion. In verstärktem Maße finden sich diese Eigenschaften wieder bei der R-Form, die nur noch aus sehr langen, fadenförmigen, unbeweglichen Zellen besteht und sich weiterhin auszeichnet durch vollständigen Verlust der Eigenschaften, Laktose zu vergären, Indol und Säuren und manchmal sogar Gas aus Glukose zu bilden. Bortels (Berlin-Dahlem).

Gutschmidt, H., Über oligodynamische Trinkwasserbereitung mittels verschiedener Katadynverfahren. (Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. Bd. 116. 1934. S. 421—432.)

Es wird bestätigt, daß die oligodynamische Wirkung des Silbers in Form des Katadynverfahrens für die Trinkwasserdesinfektion verwertbar ist. Als Indikator für die bakterizide Wirkung wurde Bact. coli verwendet. Aber nicht jeder Colistamm ist dafür geeignet. Die Resistenz kann recht verschieden sein (wie sich auch die verschiedenen Stämme pathogener Mikroorganismen unterschiedlich verhalten). Alle Colistämme mit einer Resistenz von weniger als 6 Std. sollten von der Verwendung als Testkeim ausgeschlossen werden. Andererseits ist es unnötig, auf Stämme zurückzugreifen, deren Resistenz besonders hoch ist (12 Std.). An Apparaten gelangten zur Prüfung eine Porzellanflasche, ein Katadyn-Filtergerät und ein Elektro-Katadyn-Gerät. Für den Regelfall, daß das zu bearbeitende Wasser frei von gröberen Verunreinigungen ist, sind alle 3 Geräte anwendbar. Bei starker Verunreinigung des Rohwassers sind Flasche und Filtergerät ebenfalls ohne weiteres — allerdings mit entsprechender Verlängerung der Kontaktzeiten — zu verwenden, das Elektrogerät nur unter Vorschaltung eines Filters. Die zur Abtötung der im Wasser enthaltenen Testkeime notwendigen Einwirkungszeiten belaufen sich bei einem Keimgehalt von 20 ccm auf 4 Std. für die Flasche, 2 Std. für das Filtergerät und 6 Std. für das Elektrogerät, bei einem Keimgehalt von 20 000 ccm auf 6,4 und 12 Std. Die Leistungsfähigkeit: das Filtergerät liefert in 24 Std. je nach dem Grade der Verschmutzung des Rohwassers 30—50 l, die Flasche 6—8 l und das Elektrogerät bis zu 180 l pro Std. (sofern gröbere Beimengungen fehlen). — Die Abtötung von Amöben gelingt mit dem Katadyn-Verfahren nicht.

Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Atkinson, Nancy, The occurrence of B. aerogenes in sewage and faeces. (Austral. Journ. Exper. Biol. Vol. 12. 1934. p. 141—149.)

Wenn B. aerogenes sich in Abwässern und in menschlichen Fäkalien tatsächlich so ausgedehnt findet, wie diese Versuche zeigen, scheint es unnötig, zwischen ihm und B. coli in der bakteriologischen Prüfung von Wasser auf fäkale Verunreinigungen, einen Unterschied zu machen.

Nicol (Rothamsted).

Schädigungen der Pflanzen durch Pilze, Bakterien und filtrierbare Vira.

Straib, W., Untersuchungen zur Genetik der Gelbrostresistenz des Weizens. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 427—478.)

Verf. hat Gewächshausuntersuchungen mit insgesamt 18 Rassen von Puccinia glumarum durchgeführt, um die Vererbung der Immunität und Resistenz gegenüber diesen zu klären. Einleitend werden noch einmal die Begriffe absolute und relative Resistenz und Immunität erläutert und die Schwierigkeiten der Untersuchungen erörtert. Untersucht ist das Verhalten der F_1—F_4-Generationen. Zunächst konnte festgestellt werden, daß absolute Immunität stets ein dominantes Merkmal, das durch einen Faktor vererbt wird, und damit, wie schon früher nachgewiesen, einen genetisch scharf von allen übrigen Infektionstypen unterschiedenen Typus darstellt. Absolute und relative Resistenz verhalten sich gegenüber höherer Anfälligkeit stark wechselnd; sie sind je nach Kreuzung und Rostrasse dominant, intermediär oder rezessiv. Ihr erbliches Verhalten bleibt auch das gleiche, wenn sie in relative Immunität übergehen; an ihre Stelle können ebensogut abgestufte Anfälligkeitsgrade gesetzt werden. In einer Kreuzung konnte transgredierende Spaltung wahrscheinlich gemacht werden, wobei die Transgression in Richtung erhöhter Anfälligkeit weist. Korrelationsberechnungen haben ergeben, daß Spelzenfarbe, Begrannung, Anthozyanbildung der Koleoptilen sowie Winter- und Sommercharakter unabhängig vom Gelbrostverhalten vererbt werden. Für die praktische Züchtung ist wichtig, daß Immunität und Resistenz gegenüber zahlreichen Gelbrostrassen in derselben Kreuzung durch ein und denselben Faktor vererbt werden. Es lassen sich danach Gruppen von Rostrassen zusammenstellen, die für verschiedene Kreuzungen gleich sein können. Infolgedessen kann durch Prüfung mit nur wenigen Gelbrostrassen die Immunität und Resistenz gegen sämtliche anderen bekannten Formen bestimmt werden. Anderseits wirken für die Selektion die Dominanz des Immunitätsfaktors und das wechselnde Verhalten der Resistenz sowie die scheinbare Transgression nach der anfälligen Seite erschwerend. Immerhin ist nachgewiesen, daß es möglich ist, aus Kreuzungen von 42-chromosomigem Weizen Linien zu selektieren, die gegen sämtliche bisher bekannten Gelbrostrassen bei 15° (!) resistent oder immun sind.

Braun (Berlin-Dahlem).

Gaßner, G. und Kirchhoff, H., Zur Frage der Beeinflussung des Flugbrandbefalls durch Umweltfaktoren und chemische Beizmittel. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 487—503.)

Vergleichende Freilandversuche über den Flugbrandbefall unter verschiedenen Bodenverhältnissen haben im allgemeinen ein etwas stärkeres Auftreten von Weizen- und Gerstenflugbrand auf dem leichteren und nährstoffärmeren Boden erkennen lassen. Die Unterschiede in der Nährstoffversorgung sind künstlich dadurch gesteigert worden, daß in Gefäßen mit

besonders nährstoffarmem Boden verhältnismäßig dichte Aussaaten vorgenommen wurden. In diesem Fall waren die Unterschiede wesentlich größer, namentlich bei nicht ausreichend gebeiztem Saatgut. Ein Einfluß der Düngung ließ sich nur insoweit feststellen, als bei Volldüngung geringerer Brandbefall auftrat, dagegen keine spezifische Wirkung der einzelnen Nährstoffe sich bemerkbar machte. Tiefe Keimungstemperaturen bewirkten eine Herabsetzung des Flugbrandbefalls, deren Ursache noch nicht klargestellt ist. Die Behauptungen anderer Verff., daß Behandlung von flugbrandkrankem Saatgut mit chemischen Beizmitteln den Flugbrand steigert, konnte nicht bestätigt werden. Ebenso wurde die Wirkung vorangegangener Warmbenetzungsbeize durch Germisanbehandlung beeinträchtigt. Eine leichte Abschwächung kann eintreten, wenn osmotisch wirksame Substanzen die Wasseraufnahme herabsetzen. Braun (Berlin-Dahlem).

Lutz, G., Über den Stoffwechsel von Fusarium lycopersici und Fusarium lini. (Phytopath. Ztschr. Bd. 7. 1934. S. 585—638.)

Verf. erörtert einleitend kurz die bisherigen Kenntnisse über den Einfluß der Azidität auf Keimung und Wachstum von Fusarium und über die Veränderung der Reaktion der Nährlösung während des Wachstums. Er ist den Ursachen dieser Aziditätsänderung nachgegangen, die durch Bevorzugung bestimmter An- bzw. Kationen, durch Bildung bestimmter Stoffwechselprodukte oder durch beides gleichzeitig bedingt sein kann. Demgemäß bildet den Hauptteil der Arbeit eine Prüfung der Nährstoffaufnahme, um aus ihr den empirisch festgestellten Verlauf der ph-Kurve zu rekonstruieren. Für die ph-Kurve in Kulturen von Fusarium lycopersici und F. lini sind 4 Phasen ermittelt worden: Rückgang von 3,9 auf 3,5, Anstieg bis 7,5, geringer Rückgang oder keine Änderung, Anstieg bis 8,5. Das Sinken des ph-Wertes in der ersten Phase erklärt sich aus einem Überwiegen von Anionen infolge Bildung von organischen Säuren. Die anschließende Erhöhung des ph-Wertes ist die Folge der Bevorzugung des Nitrat- gegenüber dem Ammonstickstoff und des Verbrauches der organischen Säuren bei eintretendem Zuckermangel, auf den auch der Anstieg in der letzten Phase zurückzuführen ist, während die dritte sich aus der einseitigen Ammoniumaufnahme erklärt. In der Entwicklung der Pilze waren zwei Wachstumsperioden zu unterscheiden. Der Abschluß der ersten fällt mit dem Zuckerverbrauch zusammen, während in der zweiten Äthylalkohol als Hauptkohlenstoffquelle dient. Stickstoffquelle während der ersten ist Nitrat, während der zweiten Ammonium. Die Pufferung der Nährlösungen wird im sauren Bezirk durch die Bildung organischer Säuren erhöht, um mit dem Rückgang des Säuregehalts sich wieder der der Ausgangslösung anzugleichen. Versuche über die Welkewirkung von Kulturlösungen auf Tomatenpflanzen ergaben, daß die wirksamsten toxischen Stoffe nicht direkte Umwandlungsprodukte des Zuckerstoffwechsels sind; sie scheinen vielmehr mit dem Absterben des Myzels im Zusammenhang zu stehen. Ammoniak wirkt stark toxisch, Äthylalkohol in Konzentrationen von 2%, ohne daß er aber unter natürlichen Verhältnissen zum Absterben der Wirtspflanze, sondern nur zu ihrer Schwächung wird führen können.

Braun (Berlin-Dahlem).

Abgeschlossen am 27. Juli 1935.

Zentralblatt für Bakt. etc. II. Abt. Bd. 92. No.
Ausgegeben am 30. September 1935.

Nachdruck verboten.

Report on Proposals

Submitted by **R. E. Buchanan** and by **H. J. Conn**

Relative to the Conservation of Bacillus as a Bacterial Generic Name, Fixing of the Type Species and of the Type or Standard Culture.

[Nomenclature Committee International Society for Microbiology.]

By **R. S. Breed**, Geneva, New York, U. S. A., and **R. St. John-Brooks**, London, England. Joint Permanent Secretaries.

Following the authorization of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology, which was constituted by resolution of the Paris Congress[1]) (Appendix 1) of the above society in plenary session, invitations were sent to the individual National Committees of the International Society inviting them to appoint members to serve on the Nomenclature Committee. The majority of the National Committees responded to this request and appointed one or more members to serve as requested. In addition, the members of the Sub-Committee on Bacterial Nomenclature of the International Botanical Congress were invited to join the Committee[2]).

In the meantime, in January, 1931, by virtue of Section 4 (b) of the resolutions of the Nomenclature Commission of the above Society, which were adopted in plenary session, a proposal, having for its object the conservation of Bacillus as a bacterial generic name, the fixing of the type species and the type or standard culture of the same, had been drawn up by R. E. Buchanan (Appendix 2) along with a supplementary recommendation by H. J. Conn, recommending the conservation of the "Marburg" strain of Bacillus subtilis as the type strain (Appendix 3).

Copies of these resolutions and proposals were distributed to the members of the Nomenclature Committee, accompanied by a questionnaire and

[1]) The Second International Congress for Microbiology, will be held at Lister Institute, London, July 27 — Aug. 1, 1936.

[2]) Members of the Nomenclature Committee: Austria, A. Janke; Belgium, D. Bruynoghe, D. Renaux; Bulgaria, Wl. Markoff, T. Petroff; Canada, W. L. Holman, G. B. Reed; Denmark, M. Christiansen, V. Jensen, S. Orla-Jensen; France, Langeron, Mesnil, Prévost; Germany, K. B. Lehmann, Reiner Muller; Great Britain and Ireland, J. Ramsbottom, W. M. Scott, R. St. John-Brooks, C. A. Thaysen, P. Bruce White; Holland, H. Aldershoff, P. C. Flu, A. J. Kluyver; Hungary, A. Aujeszky, R. Manninger; Italy, Azzo Azzi, G. di Rossi; Norway, A. de Besche, J. Voss; Palestine, M. Aschner; Poland, F. Eisenberg, Z. Szymanowski; Roumania, J. Cantacuzène, C. Ionescu-Mihaiesti, G. Zotta; Russia, B. Issatchenko; Spain, F. Murillo, A. Ruiz Falco; Sweden, C. Barthel, G. Hülphers, A. Petterson; Switzerland, R. Doerr, W. Frei; United States of America, R. S. Breed, J. Howard Brown, R. E. Buchanan, I. C. Hall, E. Pribram, O. Rahn.

covering letter in English, French or German issued by the joint secretaries on December 28th, 1931 (Appendix 4), requesting replies to the questions raised by the 1st May, 1932.

On account of objections raised by M. H. Soule (1932) to the acceptance of the "Marburg" strain of Bacillus subtilis as the type strain of the organism and of his contention that the "Michigan" strain should be substituted as the type strain, cultures of both the Marburg and the Michigan strain were sent to the various members of the Nomenclature Committee.

Replies to the questionnaire of the permanent secretaries have been received from thirty-eight of the forty-nine members of the Committee appointed as above stated.

An analysis of these replies (Appendix 5) shows that the proposals of Buchanan and Conn have been approved by more than a two-thirds majority of the members who gave replies, which majority enables further action on the proposals to be taken, if considered desirable.

The resolutions of the Nomenclature Committee of the International Society for Microbiology on the above proposals are therefore as follows:

1. The Committee agrees that Bacillus Cohn, 1872, should be designated as a genus conservandum.

2. The Committee agrees that the type species of Bacillus should be designated as Bacillus subtilis Cohn, 1872.

3. The Committee agrees that the type (or standard) strain should be the Marburg strain.

4. The Committee agrees that cultures of the type (or standard) strain of Bacillus subtilis Cohn, 1872, together with complete description should be maintained at each of the recognized Type Culture Collections.

5. The Committee agrees that the genus Bacillus should be so defined as to exclude bacterial species which do not produce endospores.

6. The Committee agrees that the term Bacillus should be used as a generic name and that it should be differentiated from the term "bacillus" used as a morphological designation.

Appendix 1.

International Society for Microbiology.

Section B, Bacteriology.

The following resolutions proposed by the Nomenclature Commission of the above were unanimously adopted at the plenary session of the International Society for Microbiology held at the Pasteur Institut, Paris, on Friday the 25th July, 1930.

The Commission for Nomenclature and Taxonomy of Bacteria begs leave to report its findings to the plenary session of the First International Congress for Microbiology and to recommend the adoption of the following resolutions:

1. The founding of the International Society for Microbiology and the establishment of Congresses of Microbiology make possible for the first time adequate international cooperation relative to certain problems of microbial nomenclature. It is clearly recognized that the living forms with which the microbiologists concern themselves are in part plants, in part animals and in part primitive. It is further recognized that in so far as they may be applicable and appropriate the nomenclatural codes agreed upon by the International Congresses of Botany and of Zoology should be followed in the naming of micro-organisms. Bearing in mind, however, the peculiarly independent course of development that Bacteriology has taken in the past fifty years and the elaboration of special descriptive criteria which bacteriologists have of necessity developed, it is the opinion of the International Society for Microbiology that the bacteria constitute a group for which special arrangements are necessary.

Therefore, the International Society for Microbiology has decided to consider the subject of Bacterial Nomenclature as part of its permanent programme.

2. The International Society for Microbiology, is of the opinion that the interests of bacterial nomenclature will be best served by placing the subject in the hands of a single International Committee, under the aegis of the International Society for Microbiology, adequately representative of all departments of Bacteriology, on which experts from all spheres of bacteriological research may work together. It is recognized that the subject of bacterial nomenclature is of so wide a nature that unless the personnel of an International Committee formed to deal with it is representative of all aspects of bacteriology, it is not likely to carry weight. Such a representative Committee to be called the Nomenclature Committee for the International Society for Microbiology is hereby authorized and constituted.

3. The Nomenclature Committee for the International Society for Microbiology shall be constituted as follows:

(a) Two permanent secretaries shall be elected; one primarily to represent medical and veterinary bacteriology, the other primarily to represent the other phases of bacteriology. The following individuals are hereby appointed as Secretaries:

(I) To represent primarily medical and veterinary bacteriology — Dr. R. St. John-Brooks.

(II) To represent primarily other phases of bacteriology — Dr. R. S. Breed.

Should a secretaryship become vacant, the position may be filled pro tempore by choice of the Committee. A permanent secretary should be chosen by action of the next succeeding International Congress for Microbiology.

(b) The remaining membership of the Committee shall be nominated by such National Committees of the International Society and by such of the various National Societies affiliated with the International Society as may desire representation thereon. In addition, in order that the Committee shall be truly representative of all interests, the Committee is authorized to add such members as may be deemed desirable.

4. The duties of the Nomenclature Committee shall include the following:

(a) Through the Secretaries the members of the Committee shall be circularized with reference to such problems of bacterial nomenclature as may arise, and shall endeavor to reach an agreement. No action relating to nomenclature shall be considered complete and operative until it has been considered by all members of the Committee, until adequate publicity has been given with respect to actions proposed, until approval has been given by a two-thirds majority of the members of the Committee, and until a report has been made to the next succeeding International Congress for Microbiology and opportunity thereby given for objection, modification or rejection by action of the Congress.

(b) The Committee shall consider, among others, problems such as criteria to be employed in classification, adoption of names for genera conservanda, type species, including their identification and preservation, the encouragement of monographing of special groups or genera of bacteria by those best qualified to do the work, the enlargement of the scope and usefulness of the various type culture collections by more adequate support, and the publication and preparation of such Committee and Subcommittee reports as may be advisable.

5. Copies of these resolutions shall be submitted to the appropriate sections of the International Botanical Congress, Cambridge, 1930. It is the hope of the International Society for Microbiology that the members of the International Botanical Congress who are interested in bacterial nomenclature will see the advisability of the special questions of nomenclature of bacteria being considered by a single international authority and that they will suggest names of members of the Botanical Congress willing to serve on the Committee who, in their opinion, would add to its strength and authority.

6. In view of the adequate provision made for special regulations relating to the bacteria, and the feasibility of designating genera conservanda among the bacteria by international agreement, it is believed that the greatest stability will be conferred by the adoption of the publication of Species Plantarum by Linnaeus in 1753 as the point of departure for bacterial nomenclature. The adoption of this date is recommended. It is further suggested that no present action be taken with reference to a list of genera conservanda for the bacteria.

7. Among the most important agencies working towards satisfactory nomenclature and classification of bacteria are the several type culture collections. These constitute invaluable repositories and much of the future development of bacteriology will depend upon their adequate growth, support and utilization. In some cases, at

least they should develop into research institutes of high grade. It is urged that the co-ordination and co-operation existing among these institutions be expanded, the better to serve the interests of bacteriology in its theoretical, medical and other economic aspects. It is further urged that all bacteriologists publishing descriptions of new species or important strains of bacteria deposit pure cultures of such with a culture collection, that they may be made available to others interested. Particularly it is urged that the adequate financial support of these culture collections by official agencies, by educational and research institutions and by research foundations constitutes an important and immediate need.

Appendix 2.

Conservation of Bacillus as a Bacterial Generic Name, Fixing of Type Species, and of Type or Standard Culture.

By R. E. Buchanan, Iowa State College, Ames, Iowa, U. S. A. January, 1931.

It is proposed that —

1. Bacillus Cohn, 1872, be designated as a genus conservandum.

2. The type species of Bacillus be designated as Bacillus subtilis Cohn, 1872.

3. The type (or standard) strain be designated by a committee of experts from among the strains maintained by one of the Type Culture Collections.

4. Cultures of the type or standard strain of Bacillus subtilis Cohn, 1872, together with complete description be maintained at each of the recognized Type Culture Collections for distribution.

5. The circumscription of the genus Bacillus be so fixed as to exclude bacterial species which do not produce endospores.

6. A careful statement be prepared differentiating the use of Bacillus as a generic name from the use of bacillus as a morphological designation.

Reasons for Proposals.

1. Reasons for designation of Bacillus as a genus conservandum:

(a) Older generic names as Metallacter Perty, 1852, Vibrio Rabenhorst, 1865, Bacteridium Davaine, 1868, might be shown to have priority over Bacillus Cohn, 1872. These names have never come into common use in the literature of bacteriology, and their recognition would cause confusion (see Buchanan, 1925).

(b) Bacillus has been recognized as a generic name by most bacteriologists since 1872.

2. Reasons for fixing upon Bacillus subtilis Cohn, 1872, as the type species of the genus Bacillus. The species Bacillus subtilis was the first species described in the genus by Cohn. It has been included in the genus by the great majority of authors on systematic bacteriology, and has frequently been designated as the type. Probably the only notable exception to the recognition of Bacillus subtilis as the generic type is that of Fischer, 1892, who suggested Bacillus anthracis Cohn as the type, and defined the genus to include only non-motile rods.

3. Method for fixing upon and designating a type or standard strain and description for Bacillus subtilis. It should be possible to define Bacillus subtilis as a particular or definite strain, together with all other strains sufficiently closely related. It is necessary therefore to secure agreement as to the strain to be thus recognized. It is agreed therefore that:

(a) A special committee of experts be appointed by the International Committee on Nomenclature of Bacteria to fix upon a type or standard strain of Bacillus subtilis and to prepare an adequate description.

(b) The special committee shall —

(I) Secure, if such is in existence, a culture derived from the original culture isolated by Cohn, and which agrees with his description[1]).

(II) If (I) is not possible, secure a culture which has been described and accepted as Bacillus subtilis, and which agrees as closely as possible with the original description by Cohn (see H. J. Conn, 1930).

[1]) Prof. Neufeld reports February, 1931 that none are to be found in Berlin or Breslau.

(c) The complete description of the strain is published as a diagnosis of Bacillus subtilis, and reprints made available through the Type Culture Collections (see Bergey et al., 1934).

4. Maintenance of type strains. Cultures of the type strain of Bacillus subtilis shall be maintained in the Type Culture Collections of the Lister Institute in London, the Type Culture Collection in Chicago, and such other collections as may be designated by the International Committee on Nomenclature of Bacteria. Subcultures of this standard strain should be available to all bacteriologists.

5. Reasons for recommendations as to the generic circumscription of Bacillus makes it possible to define the genus Bacillus as containing this species together with all other species sufficiently closely related. While it is probably unwise to attempt to fix exact circumscription for the genus, it is to be recognized that fixing the type species does not sufficiently delimit the genus. The fact that Bacillus subtilis is rod shaped has led some authors to include all rod-shaped bacteria in the genus Bacillus, bringing together organisms which are quite unrelated. Others (as Migula, 1900) have emphasized the possession of peritrichous flagella by Bacillus subtilis, and have included in the genus all rods with peritrichous flagella. Others have emphasized production of endospores as particularly important.

It is recommended that no definition of the genus Bacillus be recognized which includes bacterial species that do not produce endospores at some stage in their cycle of development. It should be recognized that such an agreement would not necessarily imply the inclusion of all spore-bearing rods in the genus Bacillus. It would not interfere with the recognition of other genera of spore-bearing rods, such as Aerobacillus or Clostridium if it is desired to recognize these.

6. Recommendations for preventing confusion of the generic name Bacillus with similar words used as morphological designations. The root meaning of Bacillus is little rod. In practically all languages the word bacillus (or a variant spelling as the German Bazillus, the French bacille) is also used as a morphological designation for any rod-shaped organism. The constant use in the same discussion of the generic name and of the morphological term has led to much confusion, and lack of discrimination. It is recommended that the following should be regarded as a standard practice: —

(a) The generic name Bacillus is a Latin word, a proper noun, always spelled with a capital letter, and never transliterated into a vernacular. For example, the form Bazillus subtilis is quite inadmissible, as Bazillus is not a Latin word, but German.

(b) The English word bacillus, spelled without a capital, is a morphological designation. It should not be confused with the generic name Bacillus. The generic term Bacillus is underscored when typewritten and printed in italics when printed.

(c) The French word bacille is likewise a morphological designation, and should not be confused with the generic name Bacillus.

(d) The German word Bazillus is also a morphological term. Particular care should be used not to spell the generic name Bacillus with a z.

Appendix 3.

Supplementary Recommendation.

By H. J. Conn,

New York Agricultural Experiment Station, Geneva, New York, U. S. A., March 28, 1932.

I wish to recommend that the Committee on Bacteriological Nomenclature of the International Society of Microbiology select the strain kept under the name of Bacillus subtilis at the University of Marburg as the type or standard strain. This can be obtained either from the University of Marburg, Germany, or from the Pribram collection at Vienna, to which it was sent by Dr. Arthur Meyer of Marburg[1]). My reasons for this recommendation are as follows:

[1]) Also obtainable from the National Collection of Type Cultures, Lister Institute, London and the American Type Culture Collection, Chicago, Illinois.

Auch in der Bakterien-Sammlung der Biologischen Reichsanstalt Berlin-Dahlem befindet sich noch ein Marburger Stamm von Bacillus subtilis, der unmittelbar von Arthur Meyer bezogen wurde (Anmerkung des Herausgebers).

1. The only culture alleged to be Cohn's Bacillus subtilis having a longer history than this, so far as I know, is the strain which Dr. F. C. Novy obtained from Koch's laboratory at Berlin in 1888 (here called the Michigan strain. See Soule, 1932). It differs in important particulars from the Marburg strain; spore germination by stretching instead of at right angles equatorially; spores about 1 micron instead of only 0.6—0.8 micron in diameter; greater motility; more rapid liquefaction; larger gelatin colonies; not able to grow at 50° C. The Marburg strain is, as indicated, distinctly different in all of these points.

2. Cohn's original description (1872) of Bacillus subtilis would apply to any motile, thread-like organism from pea or lupine infusions. Cohn's later descriptions (1875/76) contain more recognizable characters, but indicate strongly that his cultures were not always the same or else were of mixed types. The spores are described as 0.8 micron in diameter, a statement which is not conclusive as it is on the border line between the two strains in question. Maximum temperature for growth is stated to be between 50 and 55° C. This is a more important point than is generally realized from the standpoint of identification since recent work has shown that all the common spore-formers capable of growing at 50° C. are small-spored types. Rapid motility is mentioned; no colonies are described, as gelatin plates were still unknown. The organisms are described as synonymous with Pasteur's butyric acid ferment (1872) as obtained from rennet (1875). Germination of spores was observed (1876) but the drawing illustrating the point is on too small a scale to be conclusive: one spore seems to be germinating laterally, another terminally. No such picture would have been obtained from an organism germinating by stretching. The words describing the process. (Die Sporen schwollen etwas und trieben an einem Ende einen kurzen Keimschlauch) do not indicate the important point, whether the rod protrudes in the same direction or at right angles to the axis of the spore; and the drawing suggests that both types of germination may have been observed. Cohn apparently observed spore germination only in a single instance. Brefeld (1881) in referring to spore germination insists that Cohn's conclusions in this matter were based upon insufficient observations in which he assumed an analogy with the germination of fungus spores. Neither Cohn's words nor drawings suggest germination by stretching which is the method of the Michigan strain of Bacillus subtilis. No organism, in fact, is known today whose characteristics agree in all respects with the descriptions given by Cohn.

3. Assuming, however, for the sake of the argument, that Cohn's description definitely refers to a large-spored, anthrax-like organism showing distinct motility and with polar germination of the spores, it is still unrecognizable. The following cultures recognized both by Mayer's students and by Ford and his collaborators, all seem to have these characteristics. Bacillus ruminatus, Bacillus cereus (syn. Bacillus ellenbachensis), Bacillus petasitis, Bacillus simplex and Bacillus cohaerens. It is not possible to tell which of these organisms he may have seen. Even the existence of a culture (the Michigan strain) in Koch's laboratory a decade later which is still under cultivation today does not fix the matter, as Cohn's work was done before the invention of the gelatin plate when pure cultures of saprophytes were almost unknown, and there is little probability that the organisms seen by Cohn between 1872 and 1876 were maintained in pure culture during the next ten years. None of the large spored species, it should be added (including the Michigan strain) is able, so far as we know at present, to grow at 50° C. The Michigan strain likewise grows poorly, if at all, in hay infusions prepared as Cohn prepared them.

4. To recognize Bacillus subtilis, therefore, one must take a subsequent emendation. Koch, 1877, accepts Cohn's previous statement that Bacillus subtilis differs from anthrax in being non-pathogenic and motile, but this statement does not constitute an emendation. It has been claimed that Koch published a recognizable description of Bacilllus subtilis before Brefeld, but I cannot find it. The next reference of his to Bacillus subtilis that I can find (Koch, 1881) does not describe Bacillus subtilis nor even name it other than to speak of "die Heubazillen". The first emendation available to me is that of Brefeld (1881), who refers to an 1878 paper by himself and one in 1880 by Prazmowsky, neither of which are available here.

5. Brefeld's emendation applies the term definitely to an organism with spores only 0.6 micron in diameter germinating equatorially with the rod protruding at right angles. The only other organism recognized by Meyer and his students having these two characteristics (small spores and equatorial germination) is Bacillus teres, which is distinguished by Neide (1904) as having "walzenförmig"

instead of "stäbchenförmig" spores, and today the latter species is not ordinarily recognized. Brefeld's emendation very plainly does not indicate the Michigan strain, and in general, agrees well with the characteristics of the Marburg strain. The question arises as to whether he had a pure culture, and cannot be answered with certainty, although he states that it was pure. The characteristics given, however, are consistent as applied to the Marburg strain, with one exception; a single flagellum on one or both poles. This indicates either an impure culture or poor staining; the latter is entirely probable at this early date so this can hardly be cited as proof of an impurity. Brefeld's emendation probably stands.

6. Descriptions of the organism after Brefeld are generally inconsistent. The usual form of inconsistency is to describe an organism with large spores and cultural characteristics like Bacillus cereus (syn. Bacillus ellenbachensis) or like the Michigan strain of Bacillus subtilis but at the same time with equatorial germination. In 1901, however, Gottheil (under Meyer) describes an organism in very definite terms, which plainly agrees with Brefeld's description.

7. Gottheil's emendation may be accepted if there is no adequate description before his paper. I have not made an exhaustive search of papers between 1881 and 1901, and there may be some definitely recognizable description of the organism between these two dates. I regard it as unnecessary to make the search because I consider that Brefeld's emendation constitutes a recognizable description.

Appendix 4.

Questions Submitted to Members of Nomenclature Committee.

1. Do you agree that Bacillus Cohn, 1872, should be designated as a genus conservandum?

2. Do you agree that the type species of Bacillus should be designated as Bacillus subtilis Cohn, 1872?

3. Do you agree that the type (or standard) strain should be the Marburg strain as suggested by Dr. H. J. Conn?

4. Do you agree that cultures of the type (or standard) strain of Bacillus subtilis Cohn, 1872, together with complete description should be maintained at each of the recognized Type Culture Collections?

5. Do you agree that the genus Bacillus should be so defined as to exclude bacterial species which do not produce endospores?

6. Do you agree that the genus Bacillus should be used as a generic name and that it should be differentiated from the term "bacillus" (Bazillus or bacille) used as a morphological designation?

Appendix 5.

Analysis of replies to the proposals made by R. E. Buchanan, and the supplementary recommendation by H. J. Conn.

Name of Country	Representative on Nomenclature Committee	Replies to Proposals					
		1	2	3	4	5	6
Austria	Janke (a)	Yes	Yes	Yes (k)	Yes	Yes	Yes
Belgium	Bruynoghe	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Renaux	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Bulgaria	Markoff	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Petroff	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
Canada	Holman	Yes	Yes	Yes	Yes	No (h)	Yes
	Reed	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Denmark	Christiansen	No	No	No	No	No	No
	V. Jensen	No	No	No	No	No	No
	Orla-Jensen (a)	No	No	No	No	No	No
France	Langeron	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Mesnil	No	reply				
	Prévost	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Germany	Lehmann (b)	Yes	(c)	(c)	(c)	Yes	Yes
	Reiner Müller	Yes	Yes	(d)	(d)	Yes	Yes

Name of Country	Representative on Nomenclature Committee	Replies to Proposals 1	2	3	4	5	6
Great Britain and Ireland	Bruce White	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Ramsbottom	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Scott	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	St. John-Brooks	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Thaysen	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Holland	Aldershoff	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Flu	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Kluyver (a)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Hungary	Aujeszky	Yes	Yes	(m)	(m)	Yes	Yes
	Manninger	Yes	(e)	(e)	(e)	Yes	Yes
Italy	Azzo Azzi	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	di Rossi (b)	Yes	Yes	Yes	Yes	No (f)	Yes
Norway	De Besche	No	reply				
	Voss	No	reply				
Palestine	Aschner	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Poland	Eisenberg	No	reply				
	Szymanowski	No	reply				
Roumania	Cantacuzène	No	reply				
	Ionescu-Mihaiesti	No	reply				
	Zotta	No	reply				
Russia	Issatchenko (a)	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Spain	Murillo	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Ruiz Falco	No	reply				
Sweden	Barthel	Yes	Yes (g)	Yes	Yes	Yes	Yes
	Hülphers	Yes	Yes (g)	Yes	Yes	Yes	Yes
	Petterson	Yes	Yes (g)	Yes	Yes	Yes	Yes
Switzerland	Doerr	No	reply				
	Frei	No	reply				
United States of America	Breed	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Brown	Yes	(l)	No	Yes	Yes	Yes
	Buchanan	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
	Hall	Yes	(j)	(k)	Yes	Yes	Yes
	Pribram	Yes	Yes	(k)	Yes	Yes	Yes
	Rahn	(i)	(i)	Yes	Yes	(i)	(i)

Note: The following countries, which have formed National Committees of the International Society for Microbiology, have been approached through these Committees to nominate representatives to the Nomenclature Committees, but have not yet responded: Austria (a), Argentine, Brazil, Chile, China, Czechoslovakia, Finland, Greece, India, Japan, Jugo-Slavia, Portugal, and Russia (a).

(a) Representative of International Botanical Congress.

(b) Representative of International Botanical Congress and International Society of Microbiology.

(c) Prefers Bacillus anthracis as type species.

(d) No reply to these questions. Does not know Soule's objections.

(e) Either some strain of Bacillus subtilis or Bacillus anthracis as type species.

(f) Prefers flagella as criterion.

(g) Yes. But prefers authority to be (Cohn, 1872) Brefeld.

(h) Believes Bacillus will continue to be used in broad sense by medical bacteriologists.

(i) Temporarily only. Requests that he be dropped from Committee as he does not feel that very much can be accomplished at present in regard to nomenclature.

(j) Would accept Bacillus anthracis, if Bacillus subtilis is not available.

(k) Needs further study.

(l) If possible.
(m) Does not regard either Marburg or Michigan strains as satisfactory.

Appendix 8.

Additional Statement Regarding the Identity of Bacillus subtilis.

By R. S. Breed and H. J. Conn, Geneva, New York, U. S. A., January 8, 1935.

Subsequent to the vote by the members of the Nomenclature Committee, the work of Brefeld (1878) and of Prazmowski (1880) have been made available. Brefeld describes equatorial spore germination as characteristics of the genus Bacillus and indicates that endospore formation should be accepted as one of the important differential characteristics of the genus Bacillus. He incidentally indicates that equatorial germination of the spore is found in Bacillus subtilis but does not discuss this character as one belonging to this species alone as is done by Prazmowski (1880). In this latter paper, Bacillus subtilis is designated as the type species (Hauptrepräsentant) of the genus Bacillus. Illustrations accompany his discussion and show typical equatorial germination identical in type with that described and illustrated by Brefeld (1881) the following year. As Prazmowski's emendation of Cohn's description is definite and unmistakable and precedes Brefeld's definite description, Prazmowski should apparently be credited with having proposed the first recognizable description of Bacillus subtilis.

A motion picture of spore germination has been made by Dr. S. Bayne-Jones of the University of Rochester, subsequent to the submission of these proposals to the Committee on Nomenclature and subsequent to the publication of the paper by Soule (1932). A comparative study of Bacillus cereus, the Marburg strain of Bacillus subtilis as supplied by one of us (C), and the Michigan strain of the spore former obtained from Koch's laboratory as supplied by Soule has been made in these films. These pictures show very plainly that these three cultures develop spores which germinate by three different methods. (1) Bacillus cereus germinates with typical polar germination. The rod grows out in the same direction as the long axis of the spore. The remains of the spore-coat are retained at one end of the rod for a short time, soon, however, being forced off of the end of the rod. The empty spore-coats remain among the growing rods. (2) The Marburg strain of Bacillus subtilis germinates by a protrusion of the rod at right angles or obliquely to the long axis of the spore. The rod then pulls out of the spore-coat completely, and normally rotates until it is parallel with the latter in which position it begins to multiply in both directions. (3) The Michigan strain shows a germination by a stretching of the spore. This is preceded by a swelling of the spore and a lessening of the refactive index, a chango which probably takes place at the time when the spore-coat breaks. The spore-coat ruptures in an equatorial plane and the rod begins to grow in both direction, often without any particular evidence of the spore-coat, although at other times the spore-coat is evident as caps, one on each end of the rod. In one instance, as observed in this motion picture, the two caps remain partially attached to each other, and are pulled off of the ends of the rods, both caps coming to lie on the side of the rod[1]).

Inasmuch as descriptions from Koch's laboratory at the time when the Michigan culture was obtained [Eisenberg (1886); Fränkel (1887)] describe the germination of Bacillus subtilis as equatorial, it is evident that the type of germination of the Michigan culture was not determined accurately before it was given out from Koch's laboratory as a culture of Bacillus subtilis. This is not surprising in view of the fact that the criteria used in Koch's laboratory at this time for the identification of hay bacilli were not as rigid as would be observed today. This is very definitely indicated in the article by Koch (1881) in which he describes the use of gelatin as a culture medium. The legend of Fig. 75, Tab. XIII, p. 47, reads as follows: „Bazillen, die sich aus Staub, der auf Nährgelatine ausgestreut war, entwickelt hatten. Dieselben sind beweglich und bilden an der Oberflache von Nährflüssigkeiten eine dichte, weiße Decke, würden also dem, was man gewöhnlich als Heubazillen bezeichnet, entsprechen.“

---

[1]) A limited number of copies of this film are available through the courtesy of Dr. S. Bayne-Jones and the Eastman Kodak Co., Rochester, N. Y., at a cost of $ 5.00 each. Orders should by sent directly to the Kodak Co.

There is no hint in this that the author regarded ability to grow after the boiling of a hay infusion or the equatorial germination of the spore as previously described by Prazmowski (1880) as essential characters to be determined before a culture was labelled "Heubacillus". Apparently any motile, rod-shaped, bacillus-like organism that grew with a typical pellicle on broth media was a hay bacillus to Koch at this time.

In view of the inadequacy of the original description and the lack of any authentic original culture, it is in entire harmony with the rules of nomenclature to accept the first recognizable emendation of the description by international agreement. This is the more strongly indicated in this case inasmuch as equatorial germination of the spore has been so universally accepted as a fundamental character by subsequent workers. Hence the recommendation that the authority for the name be given as follows: Bacillus subtilis Cohn (1872) emend. Prazmowski (1880).

References.

Bergey et al., Manual Determinative Bacteriology. 4th ed. Baltimore, Md. 1934. p. 421. — Brefeld, O., Sitzber. d. Gesellsch. f. Naturforsch. Freunde Berlin. Jahrg. 26, 40. 1878. — Brefeld, O., Botanische Untersuchungen über Schimmelpilze. Bd. 4. 1881. S. 36. — Buchanan, R. E., General Systematic Bacteriology. Baltimore, Md. 1925. 597 p. — Cohn, F., Beiträge z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 1. Heft 2. 1872. S. 174—177; Bd. 1. Heft 3. 1875. S. 188—196; Bd. 2. Heft 2. 1876. S. 249—276. — Conn, H. J., Journ. Inf. Dis. Vol. 46. 1930. p. 341—350. — Eisenberg, J., Bakteriologische Diagnostik, Hamburg, Germany. 1886. — Fränkel, C., Grundriß der Bakterienkunde. Berlin, Germany. 1887. S. 237. — Gottheil, O., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 7. 1901. S. 635—637; 680—681. — Koch, R., Beiträge z. Biol. d. Pflanzen. Bd. 2. Heft 2. 1876. S. 277—308. — Koch, R., Mitt. a. d. K. Gesundheitsamte. Bd. 1. 1881. S. 34—36, Fig. 75 u. 76. — Lawrence, J. S., and Ford, W. W., Journ. of Bact. Vol. 1. 1916. p. 277—316. — Meyer, A., Flora. Bd. 86. 1899. S. 428—468. — Migula, W., System der Bakterien. Jena, Germany. 1900. S. 515—516. — Neide, E., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 12. 1904. S. 550. — Prazmowski, A., Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterien-Arten. Inaug.-Diss., Univ. Leipzig. 1880. 58 S.; 2 Taf. — Soule, M. H., Journ. Inf. Dis. Vol. 51. 1932. p. 191—215.

Nachdruck verboten.

Ist eine feldmäßige mineralische Volldüngung auf dem Freilande ohne Einfluß auf die Mikroorganismentätigkeit im Boden?

[Aus dem Institut für Landwirtschaftliche Botanik der Friedrich-Wilhelms-Universität Berlin.]

Von **Horst Engel.**

Mit 8 Abbildungen im Text.

Einleitung.

Nach einer kürzlich erschienenen Arbeit von G. Barthel soll eine mineralische Volldüngung in feldmäßiger Stärke ohne Einfluß auf die Mikroorganismentätigkeit im natürlichen Boden sein. Lemmermann, der die Anregung zu der Arbeit Barthels gab und auch die Auswertung des Beobachtungsmaterials in wesentlichen Punkten beeinflußte, erinnerte kürzlich (1935) an diese Untersuchungen und wies auf die Bedeutungslosigkeit der mineralischen Dünger für das Leben der Mikroorganismen im Boden noch einmal ausdrücklich hin.

In Anbetracht des hohen Kalium- und Phosphorbedarfs vieler Mikroorganismen muß dieses Ergebnis überraschen, um so mehr, als die Er-

tragsfähigkeit des Bodens deutlich auf die Düngung reagierte, wie das Zurückbleiben des Pflanzenwachstums auf den dauernd ohne Phosphor oder Kalium gelassenen Parzellen zeigte.

Bei der geringfügigen Einschätzung bodenmikrobiologischer Vorgänge in der Agrikulturchemie — ich weise nur auf eine neuere Arbeit von Ehrenberg (1934) hin — war allerdings die Möglichkeit einseitiger Betrachtungsweise gegeben. In der Tat lassen die von Barthel veröffentlichten Versuchsergebnisse bei genauerer Durchsicht erkennen, daß die Geschwindigkeit der Humuszersetzung im Boden bei fortgesetzter mineralischer Volldüngung, wenn auch nicht erheblich, so doch merklich beschleunigt war. Dort, wo dagegen Kalium oder Phosphor in der Düngung dauernd fehlte, war der Abbau der Humusstoffe verlangsamt, machten sich demnach auch bei den Kleinlebewesen des Bodens Mangelerscheinungen bemerkbar.

In Anbetracht der großen Bedeutung des Bodenhumus für die Fruchtbarkeit unserer Böden verdient diese Erscheinung besondere Beachtung. Bestätigt sie doch die Erfahrung der Praxis, daß die mineralischen Dünger, so notwendig sie an sich sind, die Fruchtbarkeit eines Bodens auf die Dauer nicht nur nicht zu erhalten vermögen, sondern sie schließlich herabsetzen. Es muß bei ständiger mineralischer Volldüngung in ganz besonderem Maße für Ersatz der schnell schwindenden organischen Bodenstoffe gesorgt werden.

Barthel führte seine Arbeiten in der bakteriologischen Abteilung des ehemaligen Instituts fur Agrikulturchemie und Bakteriologie der ehemaligen Landwirtschaftlichen Hochschule in Dahlem mit mir zusammen durch. Ich machte damals Lemmermann auf das bemerkenswerte Ergebnis der Untersuchungen Barthels aufmerksam. Insbesondere brachte ich den Wunsch um Fortsetzung derselben zum Ausdruck, da es sich hier um eine Frage von großter praktischer Bedeutung handele. Lemmermann lehnte die Weiterfuhrung der Untersuchungen ab, und auch meine Absicht, die folgenden Ausfuhrungen mit der Arbeit Barthels zu verbinden, mußte ich damals aufgeben.

Aber noch aus anderen Gründen ist ein nochmaliges Eingehen auf die damaligen Beobachtungen Barthels wünschenswert. Es zeigten sich nicht nur bemerkenswerte Beziehungen der CO_2-Produktion zur Bodenfruchtbarkeit, sondern auch zur Lage der einzelnen Parzellen auf dem Felde. Barthel befaßte sich nur wenig mit diesen Zusammenhängen, so daß eine Ergänzung seiner Ausführungen nicht überflüssig erscheint.

Die folgenden Ausführungen beziehen sich lediglich auf die CO_2-Produktion des Bodens. Barthel untersuchte auch noch die CO_2-Produktion nach Zugabe von Zellulose zum Boden sowie die Stickstoffbindung nach Zugabe von Mannit. In beiden Fällen konnte er Zusammenhänge mit der Düngung nicht feststellen, wohl aber bemerkenswerte Beziehungen zur Lage der einzelnen Parzellen auf dem Felde. Auch hier wäre eine etwas tiefergehende Untersuchung der Mühe wert gewesen, vor allem was den Verlauf der Zellulosezersetzung anbetrifft, der deutliche Beziehungen zum Verlauf der „Bodenatmung“ und zur Beschaffenheit des Bodens zeigte.

Es handelte sich bei den Versuchen Barthels um einen leichten, nur schwach gepufferten, humusarmen Sandboden von schwach saurer bis deutlich saurer Reaktion. Das betreffende Versuchsfeld war nach der Standardstreifen-Methode angelegt und zur Zeit der mikrobiologischen Untersuchungen schon 3 Jahre im Versuch. Neben einem Streifen von 16 hintereinanderliegenden voll gedüngten Parzellen von je 25 qm Größe befand sich ein zweiter Streifen von 16 Parzellen, bei dem achtmal eine Kaliummangel-Parzelle mit einer Phosphormangel-Parzelle abwechselte. Das Feld erstreckte

sich in nordsüdlicher Richtung. Bezüglich weiterer Einzelheiten sei auf die Arbeit von Barthel verwiesen.

Die erste Bodenprobenahme erfolgte im Herbst 1931 (am 30. September) kurz nach Aberntung des Feldes, das mit Gerste bestanden war. Eine zweite Probeentnahme wurde am 17. Mai 1932 vorgenommen, etwa 4 Wochen nach Düngung des Feldes und nach Aussaat der Rüben.

1. Atmungsversuch I.

(Bodenprobenahme 30. Sept. 1931.)

a) Der Verlauf der CO_2-Produktion.

Barthel ging auf den zeitlichen Verlauf der CO_2-Produktion des Bodens merkwürdigerweise nicht ein, es hätte ihm sonst auffallen müssen, daß deutliche Beziehungen zwischen Mikroorganismentätigkeit im Boden und Düngung vorhanden waren.

Ich berechnete die für jeden Tag und jede Parzelle freigewordene CO_2-Menge. Parzelle 100 lieferte die höchste tägliche CO_2-Menge mit 27,1 mg je kg Boden gleich zu Anfang des Versuchs. Um vergleichbare Werte zu erhalten, wurden alle übrigen täglichen CO_2-Mengen auf diesen Wert bezogen.

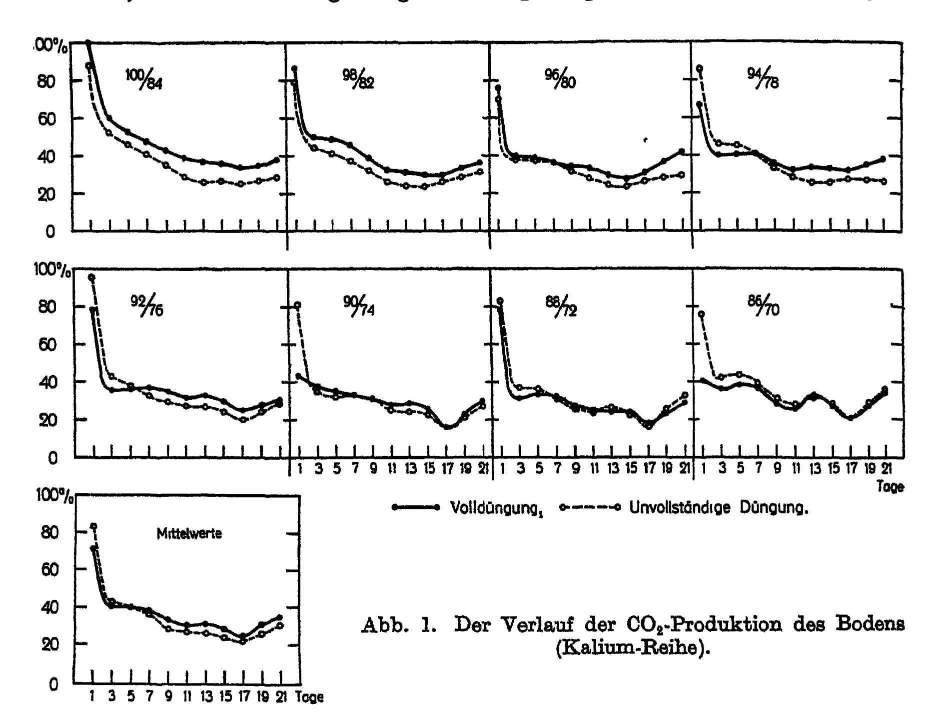


Abb. 1. Der Verlauf der CO_2-Produktion des Bodens (Kalium-Reihe).

Die Kurven der Abb. 1 geben den Verlauf der CO_2-Produktion der Kaliumreihe wieder, d. h. der K-Mangelparzellen und der zugeordneten Vollparzellen. Im einzelnen ist darüber folgendes zu sagen (die linksstehende Zahl bedeutet immer die Nummer der Vollparzelle, die rechts- und tieferstehende die der Mangelparzelle):

Süden.

Parzelle 100/84. Der Boden der Vollparzelle atmete während des ganzen Versuchs stärker als der der zugeordneten Mangelparzelle. Das Fehlen von Kalium

in der Düngung scheint die Mikroorganismentätigkeit im Boden stark herabgesetzt zu haben.

Parzelle 98/82. Auch hier war die Bodenatmung bei Volldüngung erheblich überlegen.

Parzelle 96/80. Mit Ausnahme der Zeit vom 3. bis 7. Tage war die Überlegenheit der Vollparzelle auch hier beträchtlich.

Parzelle 94/78. Zum erstenmal zeigte sich die vollgedüngte Parzelle ihrer zugeordneten Mangelparzelle anfänglich unterlegen. Aber schon nach 7 Tagen kehrte sich das Verhältnis um, so daß zum Schluß 94 weit starker atmete als 78.

Parzelle 92/76. Auch hier war die CO_2-Produktion bei Volldüngung zunächst erheblich schwächer, aber schon nach 5 Tagen merklich starker als bei Fehlen von Kalium in der Dungung, so daß die Kurven sich kreuzten.

Parzelle 90/74. Wiederum war die Mangelparzelle zu Beginn weit uberlegen. Aber schon nach 2—3 Tagen kehrte sich das Verhaltnis um: die CO_2-Produktion von 90 war von da an entweder uberlegen oder doch mindestens gleich der der Mangelparzelle. Bemerkenswert war das fast gänzliche Fehlen des anfänglichen Maximums bei 90.

Parzelle 88/72. Der Kurvenverlauf bot ein ähnliches Bild wie bei 90/74. Zunächst starke Überlegenheit bei K-Mangel, dann Angleichung der Kurven bis zur teilweisen Überlegenheit bei Volldungung.

Parzelle 86/70. Der Verlauf der CO_2-Produktion lieferte hier ganz ähnliche Kurven wie bei den zuletzt erwähnten Parzellen.

Norden.

Insgesamt betrachtet ergab sich folgendes Bild: Im südlichen Teil des Feldes atmete der Boden der voll gedüngten Parzellen während des ganzen Versuchs eindeutig stärker als der der unvollständig gedüngten Parzellen. Zur Mitte des Streifens hin verminderte sich diese Überlegenheit mehr und mehr und schlug in das Gegenteil um, jedoch nur während der ersten Versuchstage. Später bestand die Überlegenheit der Vollparzellen eindeutig fort. Im Nordabschnitt endlich verschwand auch diese spätere Überlegenheit fast gänzlich. Es fand aber im Verlauf des Versuchs eine Angleichung der Kurven statt.

Die aus den 8 zusammengehörenden Einzelkurven berechneten mittleren Kurven (siehe Abb. 1 unten links) lassen daher den Boden der voll gedüngten Parzellen erst von etwa dem 4. Tage an überlegen erscheinen. Bis dahin atmeten die Mangelparzellen stärker und die Folge war, daß bezüglich der insgesamt während der 21 Versuchstage erhaltenen CO_2-Mengen kein eindeutiger Unterschied vorhanden war. Insgesamt produzierte der Boden bei Volldüngung im Mittel 213 ± 12 mg CO_2 je kg, bei Fehlen von Kalium 204 ± 5 mg. Bei genügend langer Fortsetzung des Versuchs wäre jedoch zwangsläufig der Unterschied zwischen beiden erheblich größer und damit sicherer geworden.

Abb. 2 bringt den Kurvenverlauf bei der Phosphorreihe.

Süden.

Parzelle 99/83. Bei Fehlen von P in der Düngung war die Bodenatmung anfänglich überlegen. Aber schon nach 3 Tagen hatte sich das Verhältnis umgekehrt; die Vollparzelle blieb von da an deutlich überlegen.

Parzelle 97/81. Der Verlauf der Kurven bot hier fast das gleiche Bild wie bei 99/83.

Parzelle 95/79. Auch hier war zunächst die Mangelparzelle überlegen, später die Vollparzelle. Wäre der Versuch genügend lange fortgesetzt worden, hätte sich die Unterlegenheit der Mangelparzelle auch in den Gesamt-CO_2-Mengen zwangsläufig ergeben. So aber herrschte in dieser Hinsicht Gleichheit, wie den Zahlen der Tabelle 4 in der Barthelschen Arbeit zu entnehmen ist.

Parzelle 93/77. Die Verhältnisse lagen hier ähnlich wie bei den vorher genannten Parzellen. Vom 6. Tage an war der voll gedüngte Boden eindeutig überlegen.

Parzelle 91/75. Auch hier bot sich das gleiche Bild, mit der Ausnahme, daß im späteren Versuchsverlauf die Kurve des voll gedüngten Bodens sich nicht mehr in dem Maße wie vorher über die der Mangelparzelle erhob. Hier zeigte sich die auch bei der K-Reihe in dieser Gegend des Streifens beobachtete Angleichung der Kurven.

Parzelle 89/73. Zum erstenmal blieb die voll gedüngte Parzelle während des ganzen Versuchs unterlegen. Deutlich war aber die Angleichung der Kurven zu erkennen, und zweifellos hätte sich in Übereinstimmung mit den vorher genannten Parzellen schließlich eine Überlegenheit bei Volldüngung herausgestellt, falls der Versuch genügend lange ausgedehnt worden wäre.

Parzelle 87/71. Nach anfänglicher Unterlegenheit stellte sich auch hier spätere, wenn auch z. T. wenig ausgeprägte Überlegenheit des Bodens mit der Volldüngung heraus.

Parzelle 85/69. Diese beiden Parzellen verhielten sich wie die übrigen: erst schwächere, dann stärkere CO_2-Produktion des voll gedüngten Bodens im Vergleich zum ohne P gebliebenen Boden.

Norden.

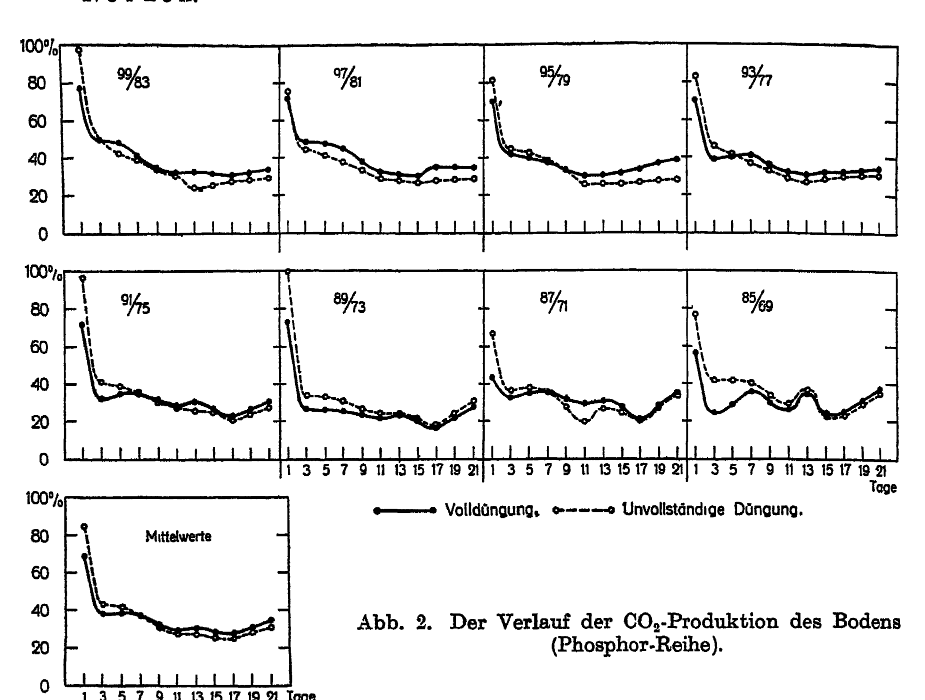


Abb. 2. Der Verlauf der CO_2-Produktion des Bodens (Phosphor-Reihe).

Von Süden nach Norden fortschreitend zeigte sich demnach auch bei der P-Reihe ein allmählicher Übergang. Allen Parzellen war die anfängliche Überlegenheit des ohne P gebliebenen Bodens gemeinsam. Je weiter die Parzellen nach Norden lagen, desto länger hielt diese an und desto größer war sie. Hier zeigte sich somit im Prinzip die gleiche Erscheinung wie bei der K-Reihe.

Die aus den einzelnen Kurven berechneten mittleren Kurven (siehe Abb. 2 links unten) verlaufen wie bei der K-Reihe. Bis etwa zum 7. Tage waren die Mangelparzellen überlegen, dann die Vollparzellen.

Die nur anfängliche Überlegenheit der CO_2-Produktion bei den Mangelparzellen hatte wie in der K-Reihe zur Folge, daß die insgesamt erhaltenen CO_2-Mengen praktisch keinen Unterschied zeigten. Sie betrugen 207 ± 10 mg je kg Boden bei Volldüngung, 209 ± 5 mg bei Fehlen von Phosphor. Wäre der Versuch jedoch über den 21. Tag wesentlich ausgedehnt worden, hätte sich die Überlegenheit bei Volldüngung zwangsläufig herausstellen müssen.

Der Verlauf der CO_2-Produktion hatte in beiden Reihen auch noch folgende übereinstimmende Regelmäßigkeiten aufzuweisen. Zunächst fand, gleichgültig ob K oder P in der Düngung vorhanden war oder nicht, ein starker Anstieg der CO_2-Produktion statt. Dieses Maximum ist auch von anderen Autoren oft beobachtet worden und hat seine Ursache in dem Reiz, den die Mikroorganismentätigkeit nach Durchmischung des Bodens erfährt. Nach Überschreitung des Höchststandes fiel die CO_2-Produktion schnell auf eine mehr oder weniger konstante Gleichgewichtslage ab, deren Höhe u. a. von den Bedingungen in den Atmungsgefäßen abhängig ist.

War der Boden an den wichtigen Nährstoffen Kalium und Phosphor verarmt — die Nährstoffarmut äußerte sich deutlich am Zurückgehen der Erträge — fand nach vorübergehender Förderung eine Hemmung der CO_2-Produktion statt. Entgegen der Ansicht Barthels und Lemmermanns waren somit zwischen Düngung und Tätigkeit der Bodenmikroorganismen sehr wohl Beziehungen nachweisbar.

b) Die Geschwindigkeit der Humuszersetzung.

Die Höhe der Bodenatmung ist kein sicherer Maßstab für die Aktivität des Mikroorganismenlebens im Boden (Engel 1934). Man kann einwenden, daß nur deshalb die Vollparzellen den Mangelparzellen schließlich überlegen waren, weil der Boden dort reicher an organischen Stoffen war. Barthel bestimmte den Kohlenstoffgehalt des Bodens jeder einzelnen Parzelle, so daß sich berechnen läßt, wieviel mg CO_2 je g Kohlenstoff von den Mikroorganismen in Freiheit gesetzt wurden. Der Einfluß, den der von Parzelle zu Parzelle stark wechselnde C-Gehalt des Bodens auf die Höhe der CO_2-Produktion ausübte, wird durch die Berechnung ausgeschaltet.

Man bekommt damit auch eine gewisse Vorstellung von der Geschwindigkeit, mit der die Bodenbewohner das ihnen zur Verfügung stehende Energiematerial des Bodens zersetzen: „Das Verhältnis CO_2/C ist ein Ausdruck für die Geschwindigkeit der Humuszersetzung. Es gibt an, wieviel Milligramm CO_2 die Bodenorganismen aus 1 g Kohlenstoff in einer gegebenen Zeit entwickeln können" (Engel 1934).

Die von Barthel durchgeführten C-Bestimmungen führten zu keinem höheren C-Gehalt bei den Vollparzellen — siehe Abb. 6 auf S. 500 —, im Gegenteil war dieser sogar im Durchschnitt etwas niedriger als bei den Mangelparzellen. Die Überlegenheit der Vollparzellen bezüglich der CO_2-Produktion muß somit die Folge der erhöhten Aktivität der Bodenmikroorganismen gewesen sein.

Die Umrechnung auf den Kohlenstoff führte zu den in Tab. 1 zusammengestellten Werten.

In 6 von 8 Fällen arbeiteten die Bodenorganismen bei fortgesetztem Fehlen von Kalium in der Düngung durchweg erheblich langsamer als bei Volldüngung, nur in 2 Fällen etwas schneller. Das waren die Parzellen 88/72 und 86/70 im nördlichen Teil des Feldes. Die Mittelwerte zeigen infolge der großen Verschiedenheit der Parallelen naturgemäß große Schwankungen, weisen aber auf K-Mangel hin.

Bei dauerndem Fehlen von Phosphor in der mineralischen Düngung war die Geschwindigkeit, mit der der Humus abgebaut wurde, in 7 von 8 Fällen erheblich geringer als bei Volldüngung, nur in einem Fall (95/79) etwas größer. Infolgedessen lag auch der Mittelwert bei P-Mangel deutlich unter dem bei Volldüngung, wenngleich die naturgemäß erheblichen mitt-

Tabelle 1.

Parzellen Nr.		Suden 100/84	99/83	98/82	97/81	96/80	95/79	94/78	93/77
mg CO_2 je 1 g Kohlenstoff in 21 Tagen	Volldüngung .	59,0	53,7	48,8	51,3	48,1	47,1	50,2	53,9
	ohne Kalium .	52,0	—	40,5	—	46,0	—	45,4	—
	ohne Phosphor	—	47,8	—	46,2	—	48,7	—	49,4

leren Schwankungen den Unterschied nicht hinreichend gesichert erscheinen lassen. Es sei daran erinnert, daß demgegenüber die Zahlen für die Bodenatmung gerade bei der P-Reihe nicht die geringsten Beziehungen zur Düngung erkennen ließen (siehe Arbeit Barthel).

Die Umrechnung der CO_2-Mengen auf den Kohlenstoff weist somit übereinstimmend darauf hin, daß fortgesetzte mineralische Volldüngung den Humusabbau im Boden beschleunigt. Das Humuskapital des Bodens wird von den Mikroorganismen, falls ihnen Kalium und Phosphor immer in ausreichenden Mengen geboten wird, schneller verzehrt, als wenn einer dieser Stoffe fehlt.

An sich war dieses Ergebnis zu erwarten, gibt es doch eine ganze Reihe von Methoden, nach denen man den Gehalt des Bodens an pflanzenaufnehmbaren Nährstoffen unter Zuhilfenahme von Bakterien oder Pilzen zu bestimmen sucht, nach denen der große Bedarf dieser Organismen an K oder P fur die Bodenanalyse ausgenutzt wird.

Bemerkenswert war auch die Abhängigkeit der Geschwindigkeit des Humusabbaues von der Lage der Parzellen auf dem Felde. Im äußersten Süden des Vollstreifens zersetzten die Kleinbewohner des Bodens den Humus im Vergleich zu allen anderen Stellen des Feldes am schnellsten. Hier waren die Bedingungen für die zerstörende Tätigkeit der Mikroorganismen offenbar am günstigsten. Es sei schon hier erwähnt, daß dort auch die besten Erträge erzielt wurden. Weiter zur Mitte verminderte sich die Geschwindigkeit der Humuszersetzung zunächst etwas, um dann noch mehr zur Mitte wieder ein wenig anzusteigen. Weiter zum nördlichen Ende erfolgte dann aber ein erheblicher Abfall. Dort wurden die niedrigsten Werte der ganzen Reihe beobachtet; auch die Ertragsfähigkeit des Bodens war dort auffallend gering. Die Abschwächung der mikrobiologischen Aktivität war deswegen besonders bemerkenswert, weil gerade in der nördlichen Hälfte des Streifens die Reaktion des Bodens schwach alkalisch war und die höchsten auf dem ganzen Streifen beobachteten Werte für den C-Gehalt des Bodens festgestellt wurden, Faktoren, die an sich günstig für die Entwicklung des Mikroorganismenlebens im Boden sind. Auf dem Mangelstreifen lagen die Verhältnisse ähnlich.

Wie bereits erwähnt wurde, hatten die großen Unterschiede der einzelnen gleichmäßig gedüngten Parzellen erhebliche Schwankungen der Mittelwerte zur Folge. Die daher noch unsicheren Schlußfolgerungen erhalten aber bei Berücksichtigung des zeitlichen Verlaufs der Humuszersetzung eine festere Grundlage. Ich berechnete den Quotienten $\frac{\text{mittlere Zersetzungsgeschwindigkeit bei Volldüngung}}{\text{mittlere Zersetzungsgeschwindigkeit bei unvollständiger Düngung}}$. Die so erhaltene Kurve — siehe Abb. 3 — wurde mit dem mittleren Verlauf der Bodenatmung verglichen, die gleichfalls als Quotient dargestellt wurde.

Tabelle 1.

								Mittelwerte	
						Norden			
92/76	91/75	90/74	89/73	88/72	87/71	86/70	85/69	K-Reihe	P-Reihe
53,7	50,6	45,1	40,3	38,8	36,7	34,2	37,3	47,2 ± 2,8	46,4 ± 2,5
45,2	—	40,1	—	42,8	—	37,3	—	43,7 ± 1,6	—
—	42,5	—	39,1	—	34,4	—	36,0	—	43,0 ± 2,1

Anfangs war der Quotient in der K- wie auch in der P-Reihe erheblich < 1, d. h. zunächst zersetzten die Kleinbewohner des Bodens den Humus bei unvollständiger Dungung schneller. Bei der K-Reihe wurden die Werte aber schon nach 3 Tagen, bei der P-Reihe nach 4 Tagen > 1. d. h. von nun an zerstörten die Bodenmikroben den Humus bei Volldüngung schneller. Ein ähnliches Bild lieferten auch die Kurven der Bodenatmung: bei Bezugnahme der CO_2-Mengen auf den Kohlenstoff trat aber der fördernde Einfluß der Volldüngung fruher und stärker hervor als bei Bezugnahme auf den Boden. Das Verhältnis CO_2 C (Humuszersetzung) scheint damit zur Erkennung feiner Unterschiede im Nährstoffvorrat des Bodens besser geeignet zu sein, als das Verhältnis CO_2 / Boden (Bodenatmung).

Ausschlaggebend für die Sicherheit des Unterschiedes zwischen Volldüngung und unvollständiger Düngung ist nun die Tatsache, daß mit Ausnahme der ersten 3—4 Tage die Überlegenheit bei Volldüngung während des ganzen Versuchs anhielt, und sich nicht nur rein zufällig in den mittleren Endsummen an Kohlensäure äußerte. Lediglich jene eigenartige, bei fast allen Parzellen aufgetretene Erscheinung, daß der den Mangelparzellen entnommene Boden anfänglich aktiver war als der von den Vollparzellen, scheint den bisher gezogenen Schlußfolgerungen ganz und gar zu widersprechen.

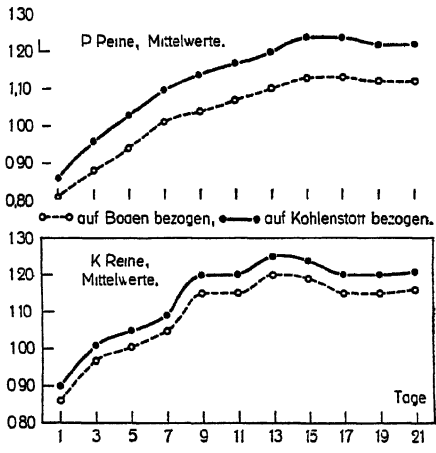


Abb. 3. Verhaltnis von CO_2-Produktion bei Volldungung / CO_2-Produktion bei unvollstandiger Dungung.

Wie ist jene Erscheinung zu erklären? Läßt sie sich insbesondere mit der Düngung auf dem Felde in Beziehung bringen? In diesem Zusammenhang sei auf Untersuchungen von Christensen hingewiesen, die erst nach dessen Tod durch Jensen (1931) veröffentlicht wurden. Auf dem Versuchsfeld in Askov in Dänemark lief ein Dauerdüngungsversuch. Einige Versuchsschläge blieben dauernd ohne jede organische und mineralische Düngung. Wider Erwarten atmete dieser Boden stärker als der von den anderen Parzellen, die dauernd entweder Stallmist oder mineralische Volldüngung erhielten und erheblich bessere Erträge lieferten. Nach Ansicht Christensens bewirkte das Fehlen der Düngung auf dem Felde ein Zurückbleiben der Zersetzung der organischen Bodenstoffe. Die fortgesetzte Düngung des Bodens sollte demgegenüber den Zersetzungsgrad dieser Stoffe

weitgehend gefördert haben. Die Folge sollte sein, daß bei den günstigeren Temperatur- und Feuchtigkeitsverhältnissen im Laboratorium die Mikrobentätigkeit im ungedüngten Boden mit seinen noch verhältnismäßig großen Mengen leicht zersetzlicher organischer Stoffe einen starken Auftrieb erfuhr, während das bei dem immer mit ausreichenden Mengen von Nährstoffen versehenen Boden in dem Maße nicht mehr möglich war. Bei diesem war schon im freien Lande der Zersetzungsgrad der organischen Substanz des Bodens weitgehend fortgeschritten.

Vermutlich lagen die Verhältnisse auf dem Versuchsfeld in Dahlem ebenso. Der anscheinend geringere Zersetzungsgrad des organischen Bodenkomplexes bei den Mangelparzellen führte, nachdem der Boden in das Laboratorium gebracht und in die Atmungsgefäße gefüllt worden war, zu einem zunächst starken Anstieg der Mikroorganismentätigkeit. Was auf dem Felde unterbleiben mußte, wurde im Laboratorium nachgeholt. Später machte sich dann das Fehlen der lebenswichtigen Stoffe Kalium und Phosphor naturgemäß um so schärfer bemerkbar, und die Folge war ein schärferes Absinken der CO_2-Produktion bei unvollständiger Düngung im Vergleich zur Volldüngung.

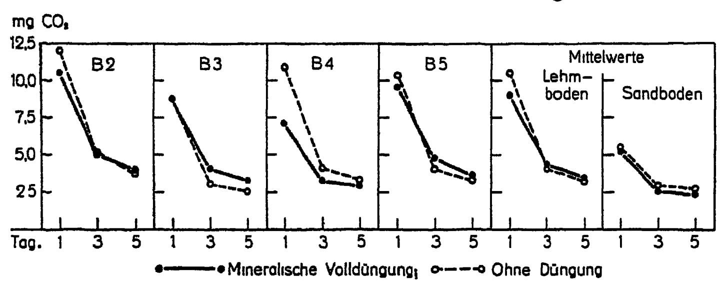


Abb. 4. Verlauf der CO_2-Produktion des Bodens vom Lehm- und vom Sandfeld in Askov (Arbeit Christensen).

Zu fordern wäre allerdings, daß auch bei den Versuchen Christensens die CO_2-Produktion jenen eigenartigen Verlauf zeigen müßte. Bei näherer Prüfung der von Jensen mitgeteilten Daten findet sich in der Tat unsere Forderung, wenigstens teilweise, erfüllt — siehe Abb. 4. Bei den Böden vom Lehmfeld in Askov war die CO_2-Produktion im Durchschnitt bei „Ungedüngt“ anfangs stärker als bei „Künstdünger“ und später kehrte sich, ganz wie bei den Versuchen Barthels, das Verhältnis um. In allen Fällen war der Abfall der Kurve nach anfänglichem Maximum bei Fehlen jeder Düngung steiler als bei Volldüngung. Die Folge davon war im Prinzip überall gleich: Entweder kreuzten sich die Kurven wie bei B 2 und B 5; oder sie näherten sich einander, falls der Kreuzungspunkt noch nicht erreicht war wie bei B 4; oder sie entfernten sich voneinander, falls die Überschneidung schon vor der ersten CO_2-Bestimmung erfolgt sein mußte wie bei B 3. Das Bild wäre bei länger anhaltendem Versuch zwangsläufig noch klarer gewesen.

Beim Sandboden von Askov kreuzten sich die Kurven nur in einem Fall, im Mittel war kein Unterschied vorhanden.

Nebenher sei noch auf folgendes aufmerksam gemacht: Die mittleren Endsummen an CO_2 waren beim Lehmboden beträchtlich größer als beim Sandboden. Sie betrugen beim Lehmboden nach 5 Tagen: ohne Düngung 32,4 $\pm$ 2,5 mg je 100 g Boden, bei mineralischer Volldüngung 30,3 $\pm$ 2,6 mg; beim Sandboden: ohne Düngung 19,7 $\pm$ 1,3 mg, bei Volldüngung 18,4 $\pm$ 2,0 mg. Christensen schloß daraus: „Wenn die Humusstoffe des Lehmfeldes schneller abgebaut werden als die des Sandfeldes, so beruht das wahrscheinlich auf dem höheren Stickstoffgehalt der betreffenden Bodenprobe.“

In Wirklichkeit wurden jedoch die Humusstoffe des Lehmbodens nicht oder doch nur sehr wenig schneller abgebaut. Die Höhe der Bodenatmung ist, wie bereits erwähnt wurde, kein Ausdruck für die Geschwindigkeit, mit welcher die Kleinbewohner des Bodens den Humus zersetzen. Erst die Bezugnahme der beobachteten CO_2-Mengen auf den Kohlenstoff bzw. auf den Humus selbst gewährt darüber gewissen Aufschluß. Auf 1 g Humus wurden beim Lehmboden in Freiheit gesetzt: ohne Düngung 11,7 ± 1,2 mg CO_2, Volldüngung 10,4 ± 1,1 mg; beim Sandboden: ohne Düngung 10,7 ± 0,9 mg, Volldüngung 8,9 ± 0,9 mg. Die Unterschiede zwischen beiden Böden lagen demnach innerhalb der mittleren Schwankung. Die geringe Überlegenheit des Lehmbodens kam nur dadurch zustande, daß er zu Beginn besonders aktiv war, später sogar dem Sandboden unterlegen war. Das zeigt sehr deutlich der Kurvenverlauf in Abbildung 5. Die größere Luftkapazität beim Sandboden führte auf die Dauer zu erhohten Leistungen bei den Mikroorganismen. Wir haben hier wiederum ein Beispiel dafür, daß die Bestimmung der Bodenatmung ohne Berücksichtigung der im Boden vorhandenen Mengen an organischen Stoffen zu ganz irrigen Schlußfolgerungen in Hinsicht auf die Mikroorganismentätigkeit führen kann.

Zur restlosen Klärung der Frage, ob die Überschneidung der Kurven auf die oben angedeutete Verschiedenheit der Zusammensetzung der organischen Bodensubstanz bei den Voll- und bei den Mangelparzellen beruhe, wäre eine eingehende chemische Untersuchung erforderlich, vielleicht eine Fraktionierung des Humus nach dem von U. Springer (1931) ausgearbeiteten Verfahren mit Azetylbromid.

Auf den Seiten 493 und 494 wurde schon erwähnt, daß je weiter die Parzellen nach Norden lagen, desto später sich die Überlegenheit des voll gedüngten Bodens herausstellte. Auch diese Erscheinung läßt sich mit den Beobachtungen Christensens in Einklang bringen. Im nördlichen Teil des Versuchsstreifens herrschten für das Mikroorganismenleben besonders ungünstige Bedingungen, auf die ich später noch näher eingehen werde. Der Zersetzungsgrad der organischen Bodenstoffe dürfte dort besonders gering gewesen sein, vor allem naturgemäß bei den Mangelparzellen. Die Folge davon war, daß die Mikroorganismentätigkeit einen besonders starken oder lange anhaltenden Auftrieb im Laboratorium erfuhr. Es scheint überhaupt, als ob dieser Reiz im Laboratorium um so größer ist, je geringer die Tätigkeit der Bodenorganismen im freien Lande war.

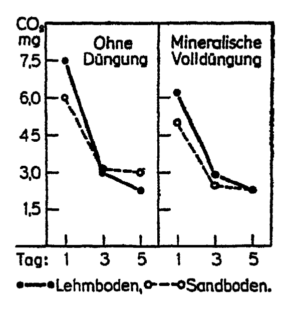


Abb. 5. Geschwindigkeit der Humuszersetzung.

c) CO_2-Produktion des Bodens und Ertragsfähigkeit.

Auch auf die Beziehungen zwischen CO_2-Produktion und Ertragsfähigkeit ging Barthel nur wenig ein. Das Fehlen von K und P in der Düngung hatte sich zwar auf die Höhe der Erträge deutlich bemerkbar gemacht, da aber ein Einfluß auch auf die Mikroorganismentätigkeit nicht festgestellt werden konnte, schien er eine weitere Nachforschung in der genannten Richtung nicht für nötig gehalten zu haben.

In Abbildung 6 sind Ertragsfähigkeit, Höhe der Kohlenstoffzersetzung und Kohlenstoffgehalt des Bodens einer jeden Parzelle bildlich dargestellt worden. Die Ertragsfähigkeit wurde nach dem von Barthel in seiner eingangs zitierten Arbeit auf Seite 106/107 beschriebenen Verfahren berechnet unter Einbeziehung der Mangelparzellen. Da im ganzen 32 Teilstücke vorhanden waren, entstanden 32 Rangstufen. Zum Unterschied wurde die an erster Stelle stehende Parzelle nicht mit der Zahl 1, die zweite nicht

mit 2, die dritte nicht mit 3 usw. multipliziert, sondern mit 32 bzw. 31 bzw. 30 usw.

Dadurch erhielt die beste Parzelle die höchste Rangzahl. Diese betrug 114. Um sie mit den Werten für den Kohlenstoff und für die mikrobiologische Tätigkeit vergleichen zu können, wurde sie auf 100 ermäßigt und alle übrigen Rangzahlen entsprechend herabgesetzt.

Jede der Säulen in der Abbildung zeigt in ihrer linken Hälfte die vollständig gedüngte, in ihrer rechten die zugehörige unvollständig gedüngte Parzelle. Die p_H-Werte des Bodens jeder Parzelle sind mit in die Abbildung aufgenommen.

Mit nur einer Ausnahme — Parzelle 85/69 — war die Ertragsfähigkeit bei Volldüngung stets größer als bei Fehlen von Kalium oder Phosphor in

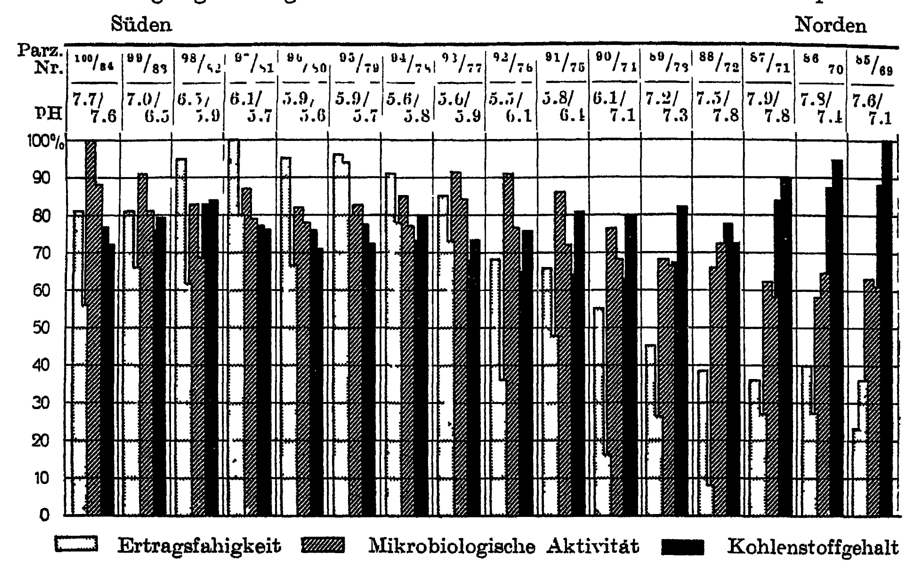


Abb. 6. Die Beziehungen zwischen Ertragsfähigkeit, Geschwindigkeit der Humuszersetzung und Kohlenstoffgehalt.

der Düngung, gleichgültig, welchen Teil des Streifens man betrachtet. Ferner bemerkt man, daß das Pflanzenwachstum auf Kalium deutlicher als auf Phosphor reagierte.

Auch die organischen Stoffe des Bodens zersetzten sich in der überwiegenden Zahl der Fälle dort, wo K oder P in der Düngung fehlte, langsamer als dort, wo immer voll gedüngt wurde. Von insgesamt 16 Fällen sind nur drei Ausnahmen vorhanden — Parzelle 95/79, 88/72 und 86/70.

Von der Mitte des Feldes angefangen bis zum nördlichen Ende erfuhr die Ertragsfähigkeit eine auffallende Verminderung. Auch die Aktivität der Bodenbewohner schwächte sich in gleicher Richtung bedeutend ab, wenn gleich nach anderem Maßstab. Da die Säulen der Ertragsfähigkeit nicht die wahre Produktion an Pflanzenmasse zum Ausdruck bringen, Ertragsfähigkeit und Mikroorganismentätigkeit auch nicht auf alle Bodenfaktoren in gleicher Weise antworten, muß naturgemäß der Maßstab ein verschiedener sein. In der südlichen Hälfte waren sowohl Bodenfruchtbarkeit wie auch Mikroorganismentätigkeit relativ am höchsten.

In großen Zügen war somit Übereinstimmung vorhanden. Dort, wo die Bedingungen für das Pflanzenwachstum günstig waren, waren auch die Bodenorganismen zu größeren Leistungen fähig. Wo der Boden fruchtbar war, vollzog sich auch der mikrobiologische Abbau der Humusstoffe schneller als dort, wo immer nur geringe Ernten erzielt wurden.

Von besonderem Interesse ist es, nach den Ursachen für das gemeinsame Absinken der Ertragswerte und der Mikroorganismentätigkeit auf der nördlichen Hälfte des Versuchsstreifens zu suchen, waren doch, wie ein Blick auf die Abbildung 6 zeigt, Gehalt des Bodens an organischen Stoffen und Bodenreaktion gerade dort für das Wachstum der Pflanzen und für die Arbeit der Bodenbewohner relativ günstiger als irgendwo anders auf dem Streifen. In der Mitte bis kurz vor dem Ende des Streifens im Süden wurden andererseits trotz der dort deutlich sauren Reaktion des Bodens und des geringeren Gehaltes an organischen Stoffen hohe Ernten — z. B. an Rüben und Gerste — erzielt und hohe Werte für die Mikroorganismen-Aktivität festgestellt. Worauf ist diese Erscheinung zurückzuführen?

Barthel machte bereits darauf aufmerksam, daß der Boden am nördlichen Ende des Versuchsstreifens infolge seiner dort höheren Lage und seiner Beschaffenheit leichter austrocknete und in seiner Wasserversorgung schlechter gestellt war als die tiefer gelegene Mitte und der größte Teil der südlichen Hälfte. Wahrscheinlich sind Bodenreaktion und Verteilung der organischen Stoffe auf dem Streifen mit dieser besonderen Lage in Beziehung zu bringen. Infolge der schlechteren Wasserversorgung des Bodens im Norden konnten sich die Kleinbewohner des Bodens nur schlecht entwickeln. Es kam dort höchstens nach starken Regengüssen zu stärkerer Entwicklung und vermehrter Tätigkeit der Bodenmikroflora. Die auf natürlichem Wege oder durch Düngung in den Boden gelangenden organischen Stoffe wurden dort „konserviert", d. h. weniger schnell und weniger weitgehend abgebaut. Infolge der geringeren natürlichen Auswaschung war auch der Versauerungsprozeß gehemmt und damit eine neutrale bis schwach alkalische Reaktion gewährleistet. Durch das geringe Wachstum der Pflanzen verarmte der Boden nicht in dem Maße an basischen Stoffen wie die tiefer gelegene Mitte, wo durch die bedeutend besseren Ernten dem Boden beträchtliche Mengen davon entrissen wurden.

Es sei aber betont, daß naturgemaß auch noch andere Faktoren außer den bereits erwahnten mit im Spiele sein konnten. So sollen beispielsweise die mit dem aufsteigenden Kapillarwasser aus dem Untergrund heraufgebrachten Kationenmengen fur die Hohe der Bodenreaktion nicht zu unterschätzen sein. In welcher Weise dieser nach oben gerichtete Kationentransport auf den einzelnen Teilen des Versuchsfeldes wirksam war, entzieht sich meiner Kenntnis. Denkbar ware es, daß dieser Transport, insbesondere nach Regengüssen, in den trockeneren Lagen starker ist als in den von Natur feuchteren Stellen des Feldes.

Bei Versuchen mit eingegrabenen Zylindern, die von anderer Seite im Institut fur Agrikulturchemie angestellt wurden (Lemmermann und Behrens 1935), ließ sich z. B. für Phosphorsaure kein Abwandern aus der Tiefe nach oben feststellen. Damit durften auch die an die Phosphorsäure gebunden gewesenen Kationen festgelegen haben. Allerdings wurden diese Zylinder, wenigstens während der Vegetationsperiode, dauernd begossen, so daß der Boden in ihnen nicht austrocknen konnte.

Neubauerversuche und auch chemische Untersuchungen, die gleichfalls im ehemaligen Institut für Agrikulturchemie von anderer Seite ausgeführt wurden, stützten aber insofern die oben geäußerten Vermutungen, als sie zeigten, daß der Boden im nördlichen Teil des Streifens z. B. reicher an pflanzenaufnehmbarem Kalium war.

2. Atmungsversuch II.

(Bodenprobenahme 17. 5. 1932.)

Bei der Probeentnahme machten sich Schwierigkeiten bemerkbar. Es stellte sich heraus, daß die im Herbst dem Boden einverleibten organischen Dünger, insbesondere der Strohkompost, den Winter über nur sehr wenig zersetzt worden waren. Mal größere, mal kleinere Mengen davon gerieten bei der Probenahme in die für den Atmungsversuch bestimmten Bodenproben, woraus sie sich durch Absieben nur unvollständig entfernen ließen. Sie führten z. T. zu gänzlich aus dem Rahmen fallenden CO_2-Werten. Schon sehr geringe Mengen frischer organischer Stoffe, die sich bei der Kohlenstoffbestimmung im Boden noch nicht bemerkbar machen, genügen, um die Bodenatmung beträchtlich zu steigern. Außerdem enthielten die organischen Dünger naturgemäß nicht unerhebliche Mengen von Kalium und Phosphor, die ausreichten, den Bedarf der Bodenorganismen daran für eine gewisse Zeit zu decken.

Somit führte der zweite Versuch zu weniger eindeutigen Ergebnissen als der erste.

a) Der Verlauf der CO_2-Produktion.

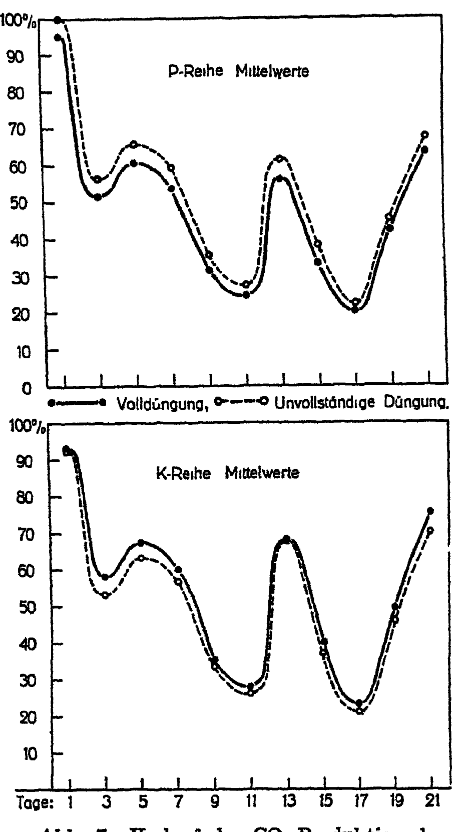


Abb. 7. Verlauf der CO_2-Produktion des Bodens bei Versuch II.

Ich kann mich auf die Wiedergabe des mittleren zeitlichen Verlaufs der CO_2-Produktion beschränken, da die einzelnen Parallelen im Gegensatz zum ersten Versuch keine prinzipiellen Unterschiede zeigten. Wie die Abb. 7 erkennen läßt, verliefen die vier Durchschnittskurven fast einheitlich (Abb. 7).

Auf den ersten Blick fallen drei Minima auf, die bei allen Kurven gleich weit voneinander entfernt sind. Diesen Tiefpunkten kommt keinerlei Bedeutung zu. Sie sind durch periodisch wiederkehrenden Sauerstoffmangel hervorgerufen worden. Nachts und während eines jeden Sonntags blieben nämlich die Atmungsgefäße bei völlig abgedrosseltem Luftstrom verschlossen. Die Folge war, daß während des Sonntags die Bodenorganismen bis zu einem gewissen Grade an Sauerstoffmangel litten. Tatsächlich lagen die Tiefpunkte übereinstimmend immer 1 Woche auseinander. Auch beim 1. Versuch war diese Periodizität, wenn auch nur schwach, zu erkennen.

Zum Unterschied fehlt auch jener Umkehrpunkt, der für den Verlauf der Kurven des im Herbst angestellten Versuchs so charakteristisch war. Von Anfang an war der voll gedüngte Boden bei der K-Reihe überlegen und

blieb es bis zum Schluß. Die Überlegenheit fällt zwar noch in die mittlere Schwankung der Parallelen, aber da sie während des ganzen Versuchs anhielt, war sie nicht zufällig. Sie weist auf K-Mangel bei den Bodenorganismen hin. Es sei hervorgehoben, daß hierin das Ergebnis des ersten Versuchs bestätigt wurde. Dort war nach Abklingen des anfänglichen Maximums die CO_2-Produktion bei Volldüngung ebenfalls überlegen.

Anders fiel dagegen das Ergebnis bei der P-Reihe aus. Während beim ersten Versuch der Mangel an Phosphor die CO_2-Produktion herabsetzte, wirkte er sich im vorliegenden Fall allem Anschein nach recht günstig aus. Die Überlegenheit des unvollständig gedüngten Bodens hielt während des ganzen Versuchs an; sie war daher nicht auf Zufälligkeiten zurückzuführen. Der Phosphor in der Düngung wird, so müßte man eigentlich daraus folgern, die Tätigkeit der Bodenbewohner gehemmt haben.

b) Die Geschwindigkeit der Humuszersetzung.

Die Umrechnung der beobachteten CO_2-Mengen auf den Kohlenstoff zeigt indessen, daß von einer Hemmung durch den Phosphor nicht die Rede sein kann. Die in der Tabelle 2 zusammengestellten Werte lassen zwischen vollständiger und unvollständiger Düngung bei der P-Reihe im Durchschnitt keinen Unterschied mehr erkennen. Man kommt unter Umständen also zu ganz irrigen Vorstellungen, wenn man bei Boden-Atmungsversuchen die festgestellten CO_2-Mengen beurteilt, ohne sie mit den im Boden vorhandenen Mengen an Kohlenstoff in Beziehung zu bringen.

Während bei der P-Reihe die auf den Kohlenstoff bezogenen CO_2-Werte bei Volldüngung in 4 Fällen größer, in 4 Fällen geringer als bei unvollständiger Düngung waren, so daß im Mittel kein Unterschied vorhanden war, lagen die Verhältnisse bei der K-Reihe günstiger. Hier war die Geschwindigkeit des Humus-Abbaues in 6 Fällen durch die Volldüngung gefördert, in einem Fall war kein Unterschied vorhanden und in einem Fall arbeiteten die Bodenorganismen bei Fehlen von K in der Düngung schneller als bei Volldüngung. Der Unterschied zwischen Volldüngung und „Ohne Kalium" beträgt im Durchschnitt etwa 10% und liegt etwas außerhalb der mittleren Schwankung, weist somit wiederum auf K-Mangel bei den Bodenorganismen hin.

Die Tatsache, daß dieser an sich nur geringfügige Unterschied während des ganzen Versuchs anhielt, im ganzen also 9mal immer wieder festgestellt werden konnte, beweist aber den K-Mangel. Während in der P-Reihe der Quotient

$$\frac{CO_2\text{-Produktion bei Volldüngung}}{CO_2\text{-Produktion bei unvollständiger Düngung}}$$

bei Bezugnahme auf den Boden während des ganzen Versuchs < 1 ist, bewegt er sich bei Bezugnahme auf den Kohlenstoff um den Wert 1, d. h. ein Einfluß der Düngung war nicht vorhanden (s. Abb. 8). Bei der K-Reihe war der Quotient schon bei Bezugnahme auf den Boden fast während des ganzen Versuchs > 1. *Bei Bezugnahme auf den Kohlenstoff verdoppelte sich der Unterschied.*

Zusammengefaßt hat der Versuch mit den im Mai 1932 genommenen Bodenproben somit ergeben, daß die Mikroorganismentätigkeit im Boden

Tabelle 2.

Parzellen Nr.		Suden 100/84	99/83	98/82	97/81	96/80	95/79	94/78	93/77
mg CO_2 je 1 g Kohlenstoff in 21 Tagen	Volldungung .	27,6	25,7	34,0	25,8	27,0	29,1	28,6	35,1
	ohne Kalium .	26,1	—	26,4	—	30,5	—	28,8	—
	ohne Phosphor	—	29,2	—	37,1	—	33,2	—	32,1

auf das Fehlen von Kalium in der Düngung reagiert hat, nicht dagegen auf das Fehlen von Phosphor. Mit den im Herbst 1931 in den Boden gebrachten organischen Dungern — Strohkompost und Luzerne — waren offensichtlich wie bereits erwähnt, gewisse Mengen an K und P in den Boden gekommen. Der Bedarf der Bodenmikroorganismen an K konnte dadurch nicht ganz befriedigt werden, wohl aber der Bedarf an P. Hiermit stimmte vorzuglich überein, daß auch das Pflanzenwachstum auf das Fehlen von Phosphor in der Düngung weniger reagierte als auf das Fehlen von Kalium (s. Abb. 6). Daß die im Herbst verabfolgte organische Düngung bei den im Fruhjahr darauf genommenen Bodenproben auch zu erheblichen Unregelmäßigkeiten hinsichtlich der CO_2-Produktion bei einer Reihe von Parzellen fuhrte, wurde schon auf Seite 502 erwähnt.

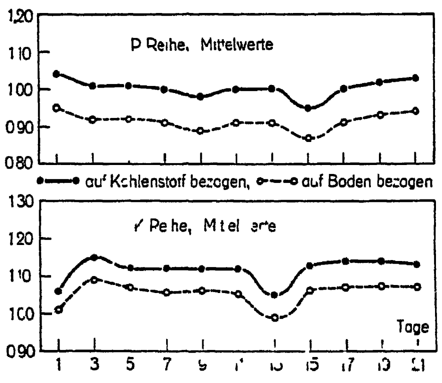


Abb. 8. Verhaltnis von CO_2-Produktion bei Volldungung / CO_2-Produktion bei unvollstandiger Dungung.

Zur Sicherung der Ergebnisse wäre es erforderlich gewesen, die Untersuchungen im Herbst 1932 und auch in den folgenden Jahren zu wiederholen. Es hätte festgestellt werden müssen, ob nach genügender Zersetzung der im Herbst 1931 in den Boden gebrachten organischen Stoffe in den folgenden Jahren das alte mikrobiologische Gleichgewicht vom Herbst 1931 sich wieder eingefunden hätte.

Was die Abhängigkeit der mikrobiologischen Tätigkeit von der Lage der Parzellen auf dem Felde (s. Tab. 2) und die Beziehungen zu den Erträgen anbelangt, lagen die Verhältnisse, von einigen aus dem Rahmen fallenden Werten abgesehen, ähnlich wie beim ersten Versuch. Ich kann mich daher hier kurz fassen. Im Norden wurden wiederum die niedrigsten Werte der ganzen Versuchsreihe beobachtet (Ausnahme Parzelle 86/70). Dort waren demnach ganz ohne Zweifel die Bedingungen für das Leben der Kleinbewohner des Bodens ungünstig. In der Mitte des Streifens dagegen, wo wiederum die p_H-Werte im deutlich sauren Gebiet lagen und relativ die niedrigsten Werte für den Gehalt des Bodens an organischen Stoffen festgestellt wurden, waren die Lebensbedingungen erheblich besser. Im Süden endlich fiel die Mikroorganismen-Aktivität, diesmal ganz in Übereinstimmung mit den Erträgen, wieder ein wenig ab (Ausnahme Parzelle 98 und 81). Nur nebenher sei noch erwähnt, daß dort auch der Humusgehalt des Bodens sowie die p_H-Werte wieder etwas anstiegen.

Tabelle 2.

						Norden		Mittelwerte	
92/76	91/75	90/74	89/73	88/72	87/71	86/70	85/69	K-Reihe	P-Reihe
34,4	35,1	29,3	24,5	24,8	22,0	34,2	27,3	$30,0 \pm 1,3$	$28,1 \pm 1,7$
30,1	—	23,4	—	22,1	—	29,5	—	$27,1 \pm 1,1$	—
—	22,8	—	22,0	—	25,3	—	21,9	—	$28,0 \pm 2,1$

Zusammenfassung.

1. Entgegen der Ansicht Barthels und Lemmermanns konnte an Hand der von diesen mitgeteilten Versuchsdaten für die CO_2-Produktion des Bodens nachgewiesen werden, daß eine mineralische Düngung in feldmäßiger Stärke die Mikroorganismentätigkeit im freien Lande beeinflußte.

2. Dieser Einfluß trat allerdings erst in Erscheinung bei Bezugnahme der beobachteten CO_2-Mengen auf den organisch gebundenen Kohlenstoff im Boden, nicht dagegen eindeutig bei der allgemein üblichen Bezugnahme auf den Boden.

3. Fortgesetzte mineralische Volldüngung beschleunigte den Abbau der wertvollen Humusstoffe durch die Bodenmikroben, fortgesetztes Fehlen von Kalium oder von Phosphor führte zu einer Verlangsamung.

4. Zwischen der Mikroorganismentätigkeit im Boden und der Ertragsfähigkeit zeigten sich bemerkenswerte Beziehungen. Wo gute Erträge erzielt wurden, war auch die Geschwindigkeit, mit der die Kleinbewohner des Bodens den Humus zersetzten, größer als dort, wo die Bodenfruchtbarkeit nur gering war.

5. Als Ursachen für das übereinstimmende Verhalten von Mikroorganismentätigkeit und Ertragsfähigkeit kamen neben dem Fehlen der wichtigen Nährstoffe Kalium und Phosphor vermutlich auch die natürliche Wasserversorgung im Boden in Frage. Dort, wo es mit dieser schlecht bestellt war, blieben sowohl Erträge als auch Mikrobentätigkeit zurück, obwohl gewisse andere Faktoren, wie z. B. Bodenreaktion und Humusgehalt, günstig waren. Wo andererseits während der Vegetationszeit mehr Wasser zur Verfügung stand, waren die Erträge erheblich besser und arbeiteten die Bodenbewohner wesentlich schneller, obgleich dort Bodenreaktion und Humusgehalt wesentlich ungünstiger waren.

Literatur.

Barthel, G., Ztschr. f. Pflanzenernahr., Dung. u. Bodenkunde. B, Bd. 13. 1934. S. 102. — Christensen, H. R. und Jensen, S. T., Archiv f. Pflanzenbau. Bd. 5. 1931. S. 1. — Ehrenberg, P., Ztschr. f. Pflanzenernahr., Düng. u. Bodenkunde. B, Bd. 13. 1934. S. 419. — Engel, H., Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 90. 1934. S. 158. — Lemmermann, O., Ztschr. f. Pflanzenernahr., Düng. u. Bodenkunde. Bd. 37. 1935. S. 213. — Behrens, W. U., Ibid. A, Bd. 36. 1934. S. 343. — Springer, U., Ibid. A, Bd. 22. 1931. S. 135.

———

Referate.

Bücher, Institutsberichte usw.

Delétang, R., Contribution à l'étude de la réaction de Gram. Paris 1933.

Verf. stellt kritische Betrachtungen an über die Gram-Färbung und über die bestehenden Theorien ihrer Wirkungsweise. Die Methodik sowohl als auch die Grenzen ihrer Anwendbarkeit, mitunter auftretende Schwierigkeiten und plötzliche Änderungen im Verhalten der Mikroorganismen werden eingehenden Betrachtungen unterzogen. In einem weiteren Kapitel kommen dann eigene Erfahrungen und Versuchsergebnisse des Verf.s zur Besprechung. Er hat vor allem den Einfluß verschiedener Faktoren auf die Gram-Festigkeit untersucht, und zwar den Einfluß der Fixierungsmethode, des Alters der Zellen, der Beschaffenheit des Kulturmediums und des Gehaltes der Zellen an Lipoiden, Nukleoproteiden und Lipoproteiden. Aus seinen Erkenntnissen zieht Verf. die Schlußfolgerung, daß die Gramsche Methode nicht nur als eine einfache Färbereaktion zu werten ist, sondern daß sie tiefe physiko-chemische Unterschiede in der Struktur der Mikrobenzellen aufdeckt. Zwar ist hierüber nicht viel bekannt, aber nichtsdestoweniger kann die Gram-Färbung in der klinischen Diagnostik und darüber hinaus bei der Klassifizierung der Organismen schon jetzt gute Dienste leisten.

Bortels (Berlin-Dahlem).

Allgemeines und Methodisches.

Angerer, K. v. und Heyer, E., Ein Lichtfilter zum leichteren Auffinden der nach Ziehl-Neelsen gefärbten Tuberkelbazillen. (Münch. med. Wochenschr. Jahrg. 82. 1935. S. 348—349.)

Die Sicherheit des Nachweises von säurefesten Stäbchen kann erheblich gesteigert werden durch Verwendung eines Trockenfilters, wie es nach den Angaben Verff. durch die Fa. Reichert, Wien, in den Handel gebracht wird. Es handelt sich um die Kombination eines Violettfilters bestimmter Dichte mit einem definierten Gelbfilter. Das Filter ist, wie die üblichen Matt- und Blauglasscheiben, unter den Abbéschen Kondensor ins Mikroskop einlegbar; seine Absorptionswirkung ist für eine Osram-Nitralampe von 60 Watt eingestellt (Mikroskopieren bei Tageslicht ist mit dem Filter nicht möglich). Säurefeste Stäbchen erscheinen auf beigefarbenem Untergrund in auffallend leuchtender rubinroter Farbe, das Begleitmaterial in reinem Grün. Stark verdeckt liegende Stäbchen sind zweifelsfrei als rot zu erkennen und können nicht übersehen werden, während ihr Auffinden ohne Filter auch geübten Untersuchern Schwierigkeiten bereiten muß. Ein weiterer Vorteil des Filters besteht darin, daß durch die Dämpfung der Gesamtintensität des Lichtes eine Blendung vermieden und die Ermüdung des Auges verzögert wird. Rodenkirchen (Königsberg i. Pr.).

Hofer, A. W., Methods for distinguishing between legume bacteria and their most common contaminant. (Journ. Amer. Soc. Agronomy. Vol. 27. 1935. p. 228—230.)

Die Unterscheidung und Trennung von Knöllchenbakterien von dem sie oft begleitenden Bacterium radiobacter soll durch Kultur auf folgender Nährlösung möglich sein: 10 g Mannit, 0,5 g K_2HPO_4, 0,2 g

$MgSO_4$, 0,1 g NaCl, 0,05 g $CaCO_3$, 3,0 g Hefenextrakt, 28 ccm norm. NaOH und 1000 ccm dest. H_2O. In dieser Lösung, die einen p_H-Wert von etwa 11 hat (!), erscheinen nach 12 Tagen bei 25° C nur Formen von Bact. radiobacter, während Knöllchenbakterien darin nicht aufkommen. Infolge der extremen Bedingungen sollen darin die Zellen stark deformiert auftreten. Engel (Berlin).

Fink, H. und Kühles, R., Beiträge zur Methylenblaufärbung der Hefezellen und Studien über die Permeabilität der Hefezellmembran. II. Mitteilung. Eine verbesserte Färbeflüssigkeit zur Erkennung von toten Hefezellen. (Ztschr. f. physiol. Chem. Bd. 218. 1933. S. 65—66.)

In früheren Untersuchungen war gezeigt worden, daß wässerige Methylenblaulösung 1 : 10 000 in salzfreier Zuckerlösung aufgeschwemmte Hefezellen in kurzer Zeit blau färbt. Der Nachweis toter Zellen ist in salzarmen Medien demnach mindestens sehr unsicher. In solchen Fällen ist es zweckmäßig, eine salzhaltige, gepufferte Methylenblaulösung 1 : 10 000 zu verwenden. Man mischt eine wässerige Methylenblaulösung (Grübler. med. par.) 1 : 5000 mit einem Phosphatgemisch (0,25 ccm m/5 Na_2HPO_4 + 99,75 ccm m/5 KH_2PO_4) zu gleichen Teilen. Die fertige Farbstofflösung hat einen p_H von 4,6. R. Koch (Berlin).

Vilsmeier, G., Beiträge zur Aspergillusmethode. (Landw. Jahrb. Bd. 78. 1933. S. 41—54.)

Die Aufnahme von Kali und Phosphorsäure durch Aspergillus niger war in vielen Fällen konstant. Es kommen aber auch bisher unerklärliche Abweichungen vor. Bei der Untersuchung verschiedener Böden kann man nicht für alle Fälle eine konstante Kali- und Phosphorsäureaufnahme durch das Pilzmyzel annehmen. Die Aufnahme dieser Stoffe wächst mit steigendem Nährstoffvorrat sowohl bei Lösungen als auch bei Böden. Die ungleichmäßige Zusammensetzung der Myzele verliert aber für die Auswertung an Bedeutung, wenn man sehr weit begrenzte Beurteilungsgruppen anwendet. Unter diesen Umständen liefert die Aspergillusmethode gute Ergebnisse. R. Koch (Berlin).

Haugaard, G., The applicability of the glass electrode to p_H measurements in biological fluids. (Compt. rend. Lab. Carlsberg. Vol. 20. 1934. Nr. 9.)

Die Glaselektrode hatte bis vor kurzem nur wenig Anwendung gefunden. Verschiedene Faktoren verhinderten die Einstellung der Konstanz des Elektrodenpotentials: Ungleichmäßige Zusammensetzung des Glases, Einfluß der Gegenwart von Salzen usw. McInnes und Malcolm Dole beseitigten diese Schwierigkeiten 1930 durch ein Spezialglas. Verf. untersuchte nun die Genauigkeit und die Brauchbarkeit der Glaselektrode für verschiedene Gebiete. Gemessen wird nach einem Kompensationsverfahren, als Nullinstrument dient das Elektrometer nach Lindemann mit nur 1 cm Kapazität. Die Anordnung der Apparatur erfolgte nach Kerridge. Von den 3 gebräuchlichen Elektrodentypen benutzte Verf. die Form von Haber und Klemenciewicz (Kugel mit langem Hals). Zur Einstellung der Konstanz wurde die Elektrode im Innern mit der Zitratlösung nach Sørensen gefullt und in destilliertes Wasser gesetzt. In den meisten Fällen war schon nach einer Woche Konstanz vorhanden (Messungen erfolgten im Luftthermostaten bei 25°). Verf. empfiehlt besonders die Verwendung der Elektroden mit kleinem asymmetrischen Potential (5 MV. und weniger). Beim Ausprobieren kontrollierte er seine Messungen mit der H-Elektrode und stellte fest, daß die Abweichungen kaum mehr als 0,3 MV. betrugen, die Elektrode wie die

H-Elektrode arbeitet (Bereich ca. 2—10), daß der Verlauf der Exponentialkurve nicht dem fur die reversible H-Elektrode gleicht. Der Salzfehler ist nicht nennenswert. Nach den Messungen mit dem Ewaldschen Test wurden noch untersucht: Suspensionen von Bodenproben (auch Filtrate), Pferdeblut, Schweinefleisch, Leber, Kinderfazes, Hefe, Hefeautolysat, Milch. In allen Fallen konnten als durchschnittliche Abweichungen von der H-Elektrode 0,02—0,03 pH-Einheiten ermittelt werden, so daß Verf. eine allgemeine Anwendung der Glaselektrode empfehlen kann.

Skallau (Berlin).

Mikrobiologie des Düngers, Bodens, Wassers und Abwassers.

Thornton, H. G., and Gray, P. H. H., The number of bacterial cells in field soils, as estimated by the ratio method. With statistical appendix by R. A. Fisher. (Proc. Roy. Soc. London. Ser. B. Vol. 115. 1934. p. 522—543.)

Bei der Bestimmung der Anzahl von Bakterien in einer Bodenprobe durch eine mikroskopische Untersuchung gefärbter Bodenpräparate ergeben sich zwei große Schwierigkeiten, nämlich erstens die hinreichend genaue Bestimmung der Masse des Bodens im Präparat, und zweitens die Schätzung der Anzahl von Organismen aus einer Reihe von gleichmäßig verteilten mikroskopischen Blickfeldern, in denen die Organismen nicht gleichmäßig verteilt sind.

Ein Verfahren, das diese Schwierigkeiten vermeidet, wird beschrieben. In einer Anzahl von Mikroskopfeldern in einer parallelen Reihe gefärbter Bodenschichten wird das Verhältnis zwischen der Anzahl von Bakterien und von Indigoteilchen bestimmt, nachdem eine Indigosuspension von bekannter Teilchenzahl zu einer gegebenen Menge Bodens zugefügt wurde. Die auf Grund dieser Verhältniszahlen bestimmten Bakterienmengen sind natürlich unabhängig von der Masse des Bodens im Präparat.

Es zeigt sich, daß die Verhältniszahlen, die man von parallelen Mikroskopfeldern bekommt, gleichmäßig verteilt sind, obgleich die Anzahl der Bakterien selbst in denselben Feldern viel stärkeren Schwankungen unterworfen ist.

Die Genauigkeit der Methode wurde u. a. folgendermaßen geprüft:

a) In vier Teilen einer bestimmten Bodenprobe stimmte die Bakterienzahl innerhalb des Standardfehlers von 3,3% überein.

b) Gezählte Suspensionen von Bakterien, die zu sterilisiertem Boden zugefügt wurden, konnten mit einem Standardfehler von 3,5% bestimmt werden.

Die Zahl von Bakterien, die nach dieser Methode im Boden von Rothamsted gefunden wurde, beträgt zwischen 1000 und 4000 Millionen pro Gramm Boden.

Bodenproben von einigen der Versuchsparzellen von Hoos field zeigten einen Zusammenhang zwischen der Gesamtzahl der Bakterien und dem mittleren Ertrag an Stroh während einer Reihe von Jahren.

Bei der Deutung der Ergebnisse von Einzelversuchen ist Vorsicht geboten, denn die Bakterienzahl scheint starken zeitlichen Schwankungen zu unterliegen. Proben von Gartenerde, die zu verschiedenen Zeiten genommen waren, zeigten deutliche Schwankungen in der Gesamtzahl der Bakterien während eines einzigen Tages. Nagelschmidt (Rothamsted).

Abgeschlossen am 22. August 1935.

Inhaltsverzeichnis.

I. Verzeichnis der in Band 92 enthaltenen Arbeiten.

II. Namen- und Sachverzeichnis.

(Stichworte, die auf Originalarbeiten hinweisen, sind durch ein * gekennzeichnet.)

Hofbuchdruckerei Rudolstadt